

МАКРОСКОПІЧНІ ЗМІНИ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО УШКОДЖЕНІЙ ВЕЛИКОГОМІЛКОВІЙ КІСТЦІ КРОЛІВ ЗА ВВЕДЕННЯ АЛОГЕННИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН РІЗНИМИ СПОСОБАМИ

*Т. Л. Савчук¹, канд. вет. наук, старший викладач;
Р. Р. Бокотько¹, канд. вет. наук, асистент;
Ю. О. Харкевич¹, канд. вет. наук, доцент;
А. Й. Мазуркевич¹, д-р вет. наук, професор;
М. О. Малюк¹, д-р вет. наук, доцент;
В. Б. Данілов¹, канд. вет. наук, доцент;
Р. С. Благий², викладач, завідувач відділенням ветеринарної медицини;
О. В. Брага³, методист, викладач вищої категорії.*

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ-41, 03041, Україна
t_sav4uk@ukr.net

²Рогатинський державний аграрний коледж
вул. М. Шашкевича, 61, м. Рогатин, Івано-Франківська обл., 77001, Україна

³Відокремлений структурний підрозділ «Новокаховський коледж Таврійського державного
агротехнологічного університету ім. Д. Моторного»
вул. Горького, 1, м. Нова Каховка, Херсонська обл., 74900, Україна

У статті наведені результати з вивчення макроскопічних змін в великогомілковій кістці кролів за експериментального механічного ушкодження після ведення алогенних мезенхімальні стовбурових клітин у яремну вену і безпосередньо в місце ушкодження кісткової тканини.

Ушкодження кісткової тканини моделювали на кролях 3-місячного віку породи шиншила, в середній третині діяфізу великогомілкової кістки. Макроскопічні дослідження процесу відновлення дефекту великогомілкової кістки проводилися на 3, 7, 14, 21, 28 і 42 доби. Проведені нами макроскопічні дослідження загоювання дефекту великогомілкової кістки свідчать про відмінність процесів регенерації у кролів контрольної групи і дослідних груп після застосування їм алогенних мезенхімальних стовбурових клітин.

Встановлено, що за введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин, процеси регенерації проходять швидше вже на 3 добу в зоні ушкодження відмічається відсутні згустки крові, а в наступні фази регенеративного остеогенезу реакції прилеглих м'яких тканин, утворення кісткового мозоля і зменшення його в об'ємі прискорені. Практично повне відновлення дефекту за введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин відбувається на 28 добу. В той час, як у тварин контрольної групи воно завершується лише на 42 добу.

Крім того встановлено що за введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин безпосередньо в місце ушкодження процеси регенерації в ділянці створеного дефекту кістки більш інтенсивно виражені в першу та подальші фази регенерації, ніж у тварин після застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин внутрішньовенно.

Отримані дані можуть бути використані для відновлення ушкодженої кісткової тканини з використанням стовбурових клітин, а також для подальших експериментальних досліджень.

Ключові слова: ВЕЛИКОГОМІЛКОВА КІСТКА, КІСТКОВА МОЗОЛЬ, КІСТКОВА ТКАНИНА, АЛОГЕННІ МЕЗЕНХІМАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ, ЯРЕМНА ВЕНА, М'ЯКІ ТКАНИНИ, ПРИПУХЛІСТЬ, КРІЛЬ.

MACROSCOPIC CHANGES IN EXPERIMENTALLY DAMAGED TIBIA OF RABBITS WHEN ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS WERE INTRODUCED IN DIFFERENT WAYS

*T. L. Savchuk¹, R. R. Bokotko¹, Ya. O. Kharkevych¹, A. Y. Mazurkevych¹,
M. O. Malyuk¹, V. B. Danilov¹, R. S. Blahyi², O. V. Braha³*

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
15, Heroiv Oborony str., Kyiv-41, 03041, Ukraine

²Rohatyn State Agricultural College
61, M. Shashkevycha str., Rohatyn, Ivano-Frankivsk region, 77001, Ukraine

³Separate Structural Subdivision Nova Kakhovka College of Dmytro Motornyi Tavria State
Agrotechnological University
1, Gorkogo str., Nova Kakhovka, Kherson region, 74900, Ukraine

The article presents the results of studying macroscopic changes in the tibia of rabbits during experimental mechanical damage after leading allogeneic mesenchymal stem cells to the jugular vein and directly to the site of bone damage.

Bone damage was modeled on 3-month-old chinchilla rabbits in the middle third of the tibial shaft. Macroscopic studies of the process of restoration of the tibial defect were carried out on 3, 7, 14, 21, 28 and 42 days. Our macroscopic studies of the healing of a tibial defect indicate a difference in the regeneration processes in rabbits of the control group and experimental groups after the use of allogeneic mesenchymal stem cells.

It was found that the introduction of allogeneic mesenchymal stem cells, regeneration processes are faster for 3 days in the area of damage, there are no blood clots, and in the subsequent phases of regenerative osteogenesis, the reaction of adjacent soft tissues, the formation of bone corns and its reduction in volume, accelerated. Almost complete restoration of the defect due to the introduction of allogeneic mesenchymal stem cells occurs on the 28 day. While in the control group of animals, it ends only at 42 days.

In addition, it was found that the introduction of allogeneic mesenchymal stem cells directly to the site of injury regeneration processes in the area of the created bone defect are more intensively expressed in the first and subsequent phases of regeneration than in animals after the use of allogeneic mesenchymal stem cells intravenously.

The obtained data can be used to restore damaged bone tissue using stem cells, as well as for further experimental studies.

Keywords: TIBIA, BONE CALLUS, BONE TISSUE, ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS, JUGULAR VEIN, SOFT TISSUE, SWELLING, RABBIT.

Незважаючи на розвиток травматології та ортопедії, питання регенерації кісткової тканини нині набуває особливого значення, оскільки нерідко зустрічаються випадки порушення консолідації кісткових відламків, результатом лікування яких є уповільнення зрощення або незрощення кісткових відламків, а великі дефекти не можуть спонтанно гоїтися (Lyskov et al., 2010; Andreichyn & Bilinskyi, 2014).

Важливою проблемою ветеринарної хірургії є вдосконалення методів зрощення переломів кісток у тварин. Разом з тим до сьогоднішнього дня, ще не достатньо вивчено всі

питання перебігу репаративного остеогенезу в умовах травми кістки, а успішне вирішення даного питання потребує від фахівця чіткого уявлення не тільки про техніку з'єднання та фіксацію відламків окремих кісток, але й фундаментальних знань щодо динаміки тканинних змін, які відбуваються в процесі репаративної регенерації, безумовного володіння методами її стимуляції і засобами попередження ускладнень (Lyskov et al., 2010; Andreichyn & Bilinskyi, 2014).

Використання стовбурових клітин все більш розширюються областями дослідження, з надією на успіх у лікуванні різних ран і травм, на які неможливо ефективно впливати сучасними методами (Clines, 2010; Petrenko et al., 2011). Вченими доведено, що червоний кістковий мозок містить мезенхімальні стовбурів клітини, які здатні до диференціювання в кісткову, хрящову, м'язову та інші види тканин, що дозволяє широко застосовувати такі клітини для прискорення регенерації різних тканин (Dimarino et al., 2013, Thormann et al., 2014). Водночас, залишаються мало дослідженими питання щодо застосування стовбурових клітин за uszkodження кісткової тканини та вплив їх на кісткову тканину.

Тому, для практичного застосування мезенхімальних стовбурових клітин необхідні додаткові дослідження, в тому числі з використанням їх у репаративній регенерації кісткової тканини, що і стало предметом даного дослідження.

Мета роботи – провести оцінку макроскопічних змін у великогомілкової кістці кролів за різних термінів репаративної регенерації після введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у кровеносне русло і безпосередньо в місце uszkodження кісткової тканини.

Матеріали і методи. Експеримент проведений на 54 кролях-самках 3-місячного віку породи шиншила, масою тіла 2,5-3 кг. Утримання піддослідних тварин та використання їх в експериментах здійснювалось у відповідності до вимог «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» (15.12.2009. Відомості ВР, 2010, №9).

Ушкодження кісткової тканини моделювали в середній третині діяфізу великогомілкової кістки, з медіальної поверхні у вигляді нанесення дірчастого дефекту. Дефект наносили за допомогою хірургічного свердла діаметром 2,5 мм під загальним наркозом тварини («Золетіл» з розрахунку 0,05 мг/кг ваги). В місці розрізу проводили місцеву анестезію 0,5 % розчином новокаїну. Оперативне поле розміром 2×2 см вибривали та дворазово обробляли 5 % розчином йоду (метод Філончикова). Всі процедури з оперативного втручання проводили відповідно до вимог асептики та антисептики. Після формування дефекту операційну рану зашивали, тварин виводили з наркозу та утримували в стаціонарних умовах кафедри хірургії і патофізіології ім. акад. І.О. Поваженка.

Тварини після формування дефекту кістки були розділені на три групи по 18 тварин в кожній, де перша група була контрольною і на наступний день введено 0,5 мл фосфатно-буферного розчину у місце експериментального uszkodження кістки. Тваринам другої групи на наступний день після нанесення травми одноразово вводили алогенні мезенхімальні стовбурів клітини в дозі $3,5 \times 10^6$ клітин на 0,5 мл фосфатно-буферного розчину у яремну вену, а кролям ІІ дослідної групи – таку ж кількість алогенних мезенхімальних стовбурових клітин безпосередньо в місце експериментального uszkodження кістки.

Для цього на кожному етапі кролів дослідних і контрольної груп піддавали евтаназії шляхом внутрішньовенного введення летальної дози натрію тіопенталу в дозі 90 мг/кг (Dzhons, 1972). Від них відбирали кістки для макроскопічної оцінки процесу регенерації кістки, де оцінювали наявність припухлості, утворення мозоля та закриття округлого дефекту (Horalskyi et al., 2005).

Результати й обговорення. В результаті проведених досліджень встановлено, що на 3 добу експерименту у кролів контрольної групи виявляли дефект кістки округлої форми,

наявність згустків крові у місці дефекту, характерних для першої стадії запалення – альтерації (рис. 1 а). Інших змін не спостерігалось. У кролів I дослідної групи відмічалася незначна припухлість м'яких тканин та відсутність згустків крові у місці дефекту та початок формування кісткового мозоля (рис. 1 б). У кролів II дослідної групи виявляли дефект кістки округлої форми, заповнений рожевою тканиною, яка виходила із кістково-мозкового каналу (рис. 1 в). Також спостерігали незначну припухлість м'яких тканин і початок утворення кісткового мозоля, який частково закривав кістковий дефект (табл.1, 2).

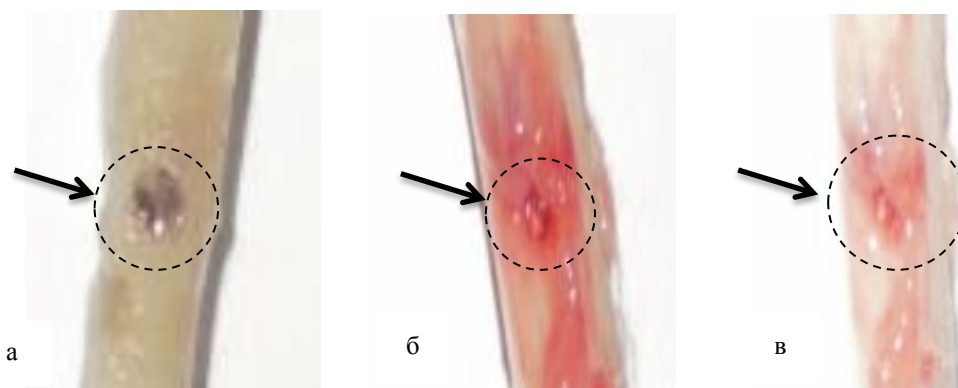


Рис. 1. Місце дефекту великогомілкової кістки кролів на 3 добу експерименту (показано стрілкою): а – контрольна група; б – I дослідна група; в – II дослідна група

Таблиця 1

Динаміка реакції прилеглих м'яких тканин на ушкодження кістки

Групи кролів	Вихідний стан	3 доба	7 доба	14 доба	21 доба	28 доба	42 доба
Контроль (плацебо)	–	–	+	+++	++	+	–
I дослідна група (МСК в яремну вену)	–	+	+++	++	+	–	–
II дослідна група (МСК в місце дефекту)	–	++	+++	++	+	–	–

Примітка: +++ сильно виражена припухлість; ++ слабо виражена припухлість; + незначна припухлість; – відсутність припухлості

Таблиця 2

Динаміка формування кісткового мозоля

Групи кролів	Вихідний стан	3 доба	7 доба	14 доба	21 доба	28 доба	42 доба
Контроль (плацебо)	–	–	+	++	+++	++	–
I дослідна група (МСК в яремну вену)	–	+	++	+++	++	+	–
II дослідна група (МСК в місце дефекту)	–	++	+++	++	+	–	–

Примітка: +++ виражений кістковий мозоль; ++ слабо виражений кістковий мозоль; + незначний кістковий мозоль; – відсутність кісткового мозоля

На 7 добу експерименту (табл.1, 2). у кролів контрольної групи відмічалася незначна припухлість м'яких тканин, формування кісткового мозоля, наявність незначної кількості згустків крові у місці дефекту (рис. 2 а). У кролів I дослідної групи спостерігали виражену припухлість м'яких тканин, ознаки утворення кісткового мозоля, який частково закривав кістковий дефект (рис. 2 б). У кролів II дослідної групи спостерігали виражену припухлість м'яких тканин, вираженні ознаки добре сформованого кісткового мозоля, який повністю закривав кістковий дефект (рис. 2 в).

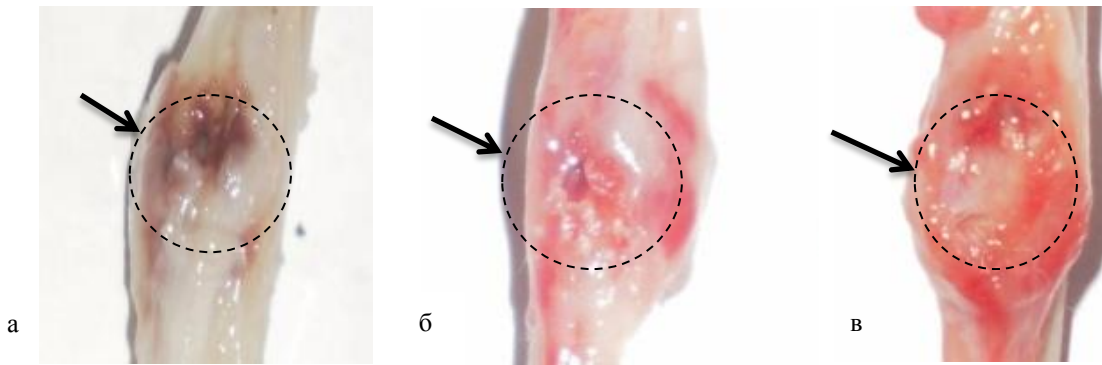


Рис. 2. Місце дефекту великогомілкової кістки кролів на 7 добу експерименту (показано стрілкою): а – контрольна група; б – I дослідна група; в – II дослідна група

На 14 добу експерименту (табл.1, 2) у кролів контрольної групи відмічалася виражена припухлість м'яких тканин, утворення кісткового мозоля, який ще не повністю закривав кістковий дефект (рис. 3 а). У кролів I дослідної групи виявлено зменшення припухлості м'яких тканин, чітко виражений кістковий мозоль, який повністю закривав кістковий дефект (рис. 3 б). У кролів II дослідної групи спостерігали зниження припухлості м'яких тканин, добре виражений кістковий мозоль, який зменшився в об'ємі (рис. 3 в).

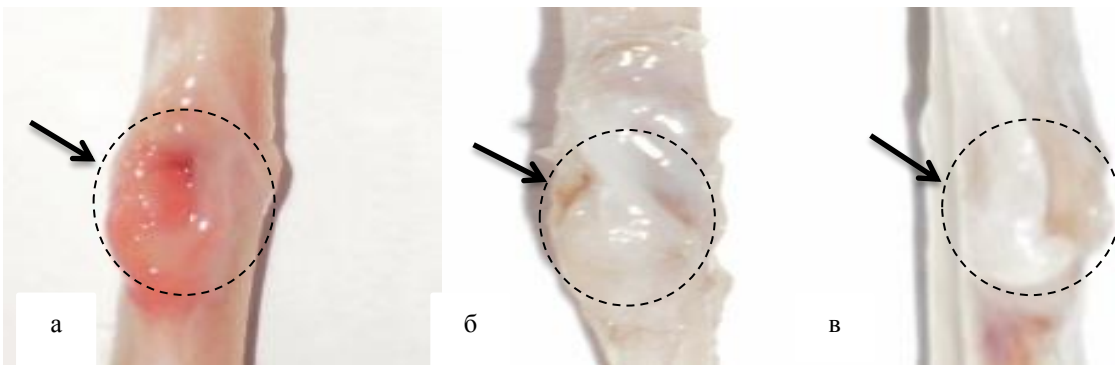


Рис. 3. Місце дефекту великогомілкової кістки кролів на 14 добу експерименту (показано стрілкою): а – контрольна група; б – I дослідна група; в – II дослідна група

На 21 добу експерименту (табл.1, 2) у кролів контрольної групи відмічали зменшення припухлості м'яких тканин та виражений кістковий мозоль, який повністю закривав кістковий дефект (рис. 4 а). У кролів I дослідної групи спостерігали ще незначну припухлість м'яких тканин і зменшення мозоля в об'ємі (рис. 4 б). У кролів II дослідної групи спостерігали незначну припухлість м'яких тканин, а кістковий мозоль мав значно менші розміри ніж у кролів I дослідної групи (рис. 4 в).

На 28 добу експерименту (табл.1, 2) у кролів контрольної групи спостерігали незначну припухлість м'яких тканин та зменшення мозоля в об'ємі (рис. 5 а). У кролів I дослідної групи виявляли відсутність припухлості м'яких тканин, кістковий мозоль зменшився в об'ємі і ущільнився до кістки, був майже не помітний (рис. 5 б). У кролів II дослідної групи ознаки загоювання були подібні до таких, як у тварин I дослідної групи, де спостерігали відсутність припухлості м'яких тканин, а кістковий мозоль зменшився в об'ємі і був уже непомітний (рис. 5 в).

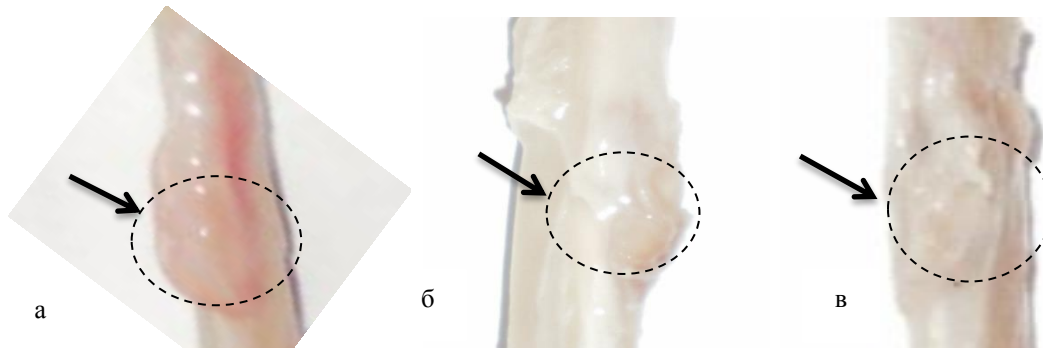


Рис. 4. Місце дефекту великогомілкової кістки кролів на 21 добу експерименту (показано стрілкою): а – контрольна група; б – I дослідна група; в – II дослідна група

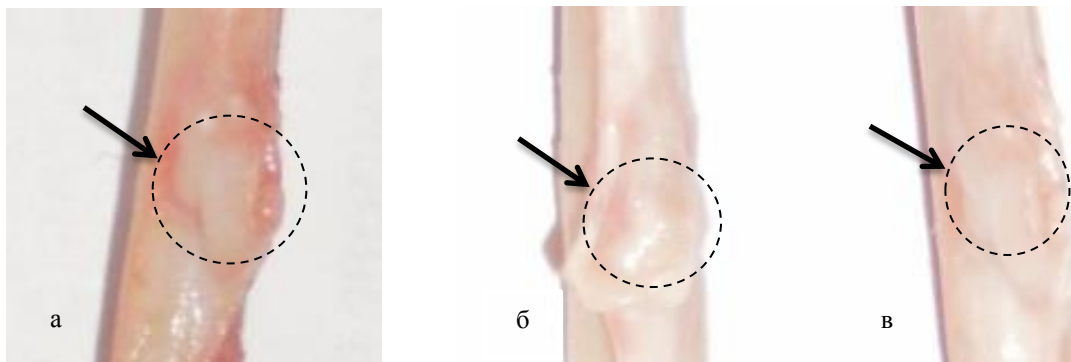


Рис. 5. Місце дефекту великогомілкової кістки кролів на 28 добу експерименту (показано стрілкою): а – контрольна група; б – I дослідна група; в – II дослідна група

На 42 добу у кролів I та II дослідних груп видимих ознак місця дефекту не виявлено (табл.1, 2). У кролів контрольної групи припухлість м'яких тканин не відмічалася, кістковий мозоль зменшився в об'ємі до кістки і був майже непомітний (рис. 6).

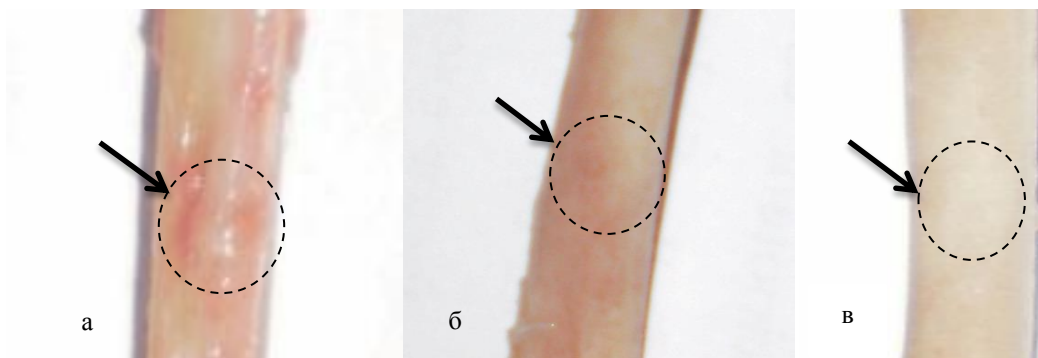


Рис. 6. Місце дефекту великогомілкової кістки кролів на 42 добу експерименту (показано стрілкою): а – контрольна група; б – I дослідна група; в – II дослідна група

ВИСНОВКИ

1. Аналіз показників макроскопічного дослідження етапів відновлення дефекту великогомілкової кістки свідчить, що за введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин, процеси регенерації проходять швидше: вже на 3 добу в зоні ушкодження відмічається відсутні згустки крові, а в наступні фази регенеративного остеогенезу реакції прилеглих м'яких тканин, утворення кісткового мозоля і зменшення його в об'ємі прискорені.

2. Практично повне відновлення дефекту за введення аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин відбувається на 28 добу, тимчасом як у тварин контрольної групи – лише на 42 добу експерименту.

3. Порівняння ефективності застосування двох способів введення аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин показало, що після застосування аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин безпосередньо в місце ушкодження процеси регенерації в ділянці створеного дефекту кістки більш інтенсивно виражені в першу та подальші фази регенерації, ніж у тварин після застосування аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин внутрішньовенно.

4. Отримані експериментальні дані можна використовувати для лікування та аналізу процесів загоєння перелому.

Перспективи досліджень. У подальших дослідженнях планується підтвердити дані макроскопічних змін гістологічними та біохімічними дослідженнями.

References

Andreichyn, V.A. & Bilinskyi, P.I. (2014). Systemnyi analiz operatyvnoho metodu likuvannia diafizarnykh perelomiv i faktory vplyvu na reparatyvnu reheneratsiiu. *Travma* 6. 59–64. [in Ukrainian].

Clines, G.A. (2010). Prospects for osteoprogenitor stem cells in fracture repair and osteoporosis. *Curr. Opin. Organ. Transplant.* 15, 1. 73–78.

Dimarino, A.M., Caplan, A.I., Bonfield, T.L. (2003). Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Front Immunol.* 4. 201.

Dzhons, L. M. (1972). *Veterinarnaja farmakologija i terapija.* Moskva. 2. 640-641. [in Russian].

Horalskyi, L.P., Khomych, V.T., Kononskyi, O.I. (2005). Osnovy histolohichnoi tekhniky i morfofunktsionalni metody doslidzhen u normi ta pry patolohii. navch. posib. Zhytomyr «Polissia». 228. [in Ukrainian].

Lyskov, A.V., Frolov, A.B., Pavlovychev, S.A. (2010). Novyi pidkhyd do stymuliatsii fiziolohichnoi ta reparatyvnoho osteohenezu. *Henii ortopedii.* 3. 34-39. [in Ukrainian].

Petrenko, A.Yu., Khunov, Yu.A., Ivanov, E.N. (2011). Stovburovi klityny. Vlastyvosti ta perspektyvy klinichnoho zastosuvannia. *Luhansk. Pres-ekspres,* 365. [in Ukrainian].

Thormann, U., Khawassna El., Ray, S. (2014). Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. *Injury, Int. J. Care Injured.* 45. 487–493.