

## Вплив умов отримання аутологічної плазми, збагаченої тромбоцитами, на динаміку морфологічних змін та деякі показники репаративної регенерації сухожилля після гострої механічної травми в експерименті

Григорівський В.В.<sup>1</sup>, Коструб О.О.<sup>1</sup>, Блонський Р.І.<sup>1</sup>, Малюк М.О.<sup>2</sup>, Григорівська А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ДУ "Інститут травматології та ортопедії НАМН України", м. Київ

<sup>2</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

**Резюме. Актуальність.** Різноманітні фактори росту впливають на структуру та функції тканини сухожилля, що регенерує. Донині не відомо, чи мають вплив умови одержання аутологічної плазми, збагаченої тромбоцитами, на стан тканин сухожилля, що регенерує після травми сухожилля. **Мета дослідження.** Встановити ефективність впливу аутологічної плазми, збагаченої тромбоцитами (АПЗТ, platelet rich plasma, PRP), що була одержана за різних умов центрифугування крові, на репаративну регенерацію ахіллового сухожилля кролів після його часткового пошкодження. **Матеріали і методи.** Часткові тенотомії виконано на 18 кролях шляхом поперечного надрізання ахіллового сухожилля на  $\frac{1}{2}$  діаметра з наступним уведенням у зону ушкодження по 0,5 мл АПЗТ, отриманої внаслідок центрифугування, яке варіювало за числом обертів та тривалістю. Строки спостереження 21, 45 та 60 днів. Виконували гістологічне та морфометричне дослідження. **Результати.** Регенерація сухожилля після часткової тенотомії відбувається внаслідок проліферації юних фібробластів насамперед у перитендинії і поширюється на деяку відстань від країв тенотомованих пучків. Із збільшенням строків у регенераті відбувається перебудова пучків колагенових волокон із відновленням їхньої товщини і паралельності та дозріванням теноцитів. Показник "вираженість контурів сухожильного регенерату" варіює: в контрольній групі дефект є добре вираженим навіть у віддалені строки, а в групах, де застосовували АПЗТ, із збільшенням строків (45, 60 днів) переважають випадки, де локус пошкодження чітко не виявляється. Показник "відносна площа ділянок проліферації незрілих фібробластів" у більшості груп, де застосовували АПЗТ, має тенденцію до зменшення із збільшенням строків спостереження, найнижчі середні параметри були в групі з найбільш інтенсивним режимом одержання АПЗТ. **Висновки.** Застосування АПЗТ для аплікації в локус тенотомії сухожилля, ймовірно, сприяє більш швидкому, ніж у контролі, дозріванню клітин-фібробластів, які утворюють сухожильний регенерат у дефекті.

**Ключові слова:** сухожилля, гостра травма, експеримент, плазма, збагачена тромбоцитами, регенерація, морфометрія.

### Вступ

Наслідки гострої механічної травми сухожилля залишаються актуальною проблемою в галузі виробничої, бойової, спортивної травми та продовжують привертати увагу дослідників різного профілю [1]. Хоча відомо, що тканина сухожилля має доволі високу здатність до регенерації, в частині випадків процес формування регенерату сухожилля відбувається неоптимально та призводить до загоєння зі зниженою міцністю або до утворення гіпертрофованого, потовщеного фіброзного регенерату, до того ж більшою чи меншою мірою зрощеного з прилеглими тканинами [2].

Оптимальні наслідки процесу зрощення після механічного пошкодження сухожилля залежать

від низки факторів [1, 3]. Це насамперед ступінь та характер первинного механічного пошкодження тканини сухожилля: розріз чи розрив [4], наявність дефекту та його розміри, повнота заповнення дефекту між кінцями пересічених пучків колагенових волокон сухожилля, особливості механічного впливу в процесі репаративної регенерації тощо [5]. Деякі автори використовували різні речовини (наприклад куркумін) для оптимізації результатів посттравматичного зрощення сухожилля [6].

В останні два десятиліття з метою здійснення впливу на процес репаративної регенерації органів опорно-рухової системи дедалі більша увага звертається на різноманітні фактори росту, які на клітинному рівні через рецептори клітинних мембран впливають на структуру

та функції клітин сухожилля, що регенерує. Важливим джерелом плазмових факторів росту є тромбоцити, у яких міститься низка інгредієнтів [7], зокрема:

- Transforming Growth Factor – Alfa (TGF- $\alpha$ );
- Transforming Growth Factor – Beta (TGF- $\beta$ );
- Platelet Derived Growth Factor (PDGF);
- Epithelial Growth Factor (EGF);
- Insulinoid Growth Factor (IGF);
- Fibroblast Growth Factor (FGF);
- Interleukin-1 (IL-1).

Ряд експериментальних досліджень присвячений впливу плазми, багатой на фактори росту, на процес відновлення сухожилля при його ураженні дистрофічної природи [7, 8, 9]. Разом із тим робіт, де б визначили вплив плазмових факторів росту на процес та наслідки репаративної регенерації сухожилля після його механічного пошкодження, зокрема розсічення, обмаль [10, 11, 12]. Так, донині не одержано відповіді на питання: чи справляють вплив умови одержання плазми, збагаченої тромбоцитами, на показники стану тканин сухожилля, що регенерує, після його гострої механічної травми?

**Мета** – на підставі експериментального дослідження встановити ефективність впливу аутологічної плазми, збагаченої тромбоцитами (АПЗТ, platelet rich plasma, PRP), що була одержана за різних умов центрифугування крові, на наслідки репаративної регенерації ахіллового сухожилля кролів при його частковому механічному пошкодженні.

## Матеріали і методи

Експериментальні часткові тенотомії виконано на 18 кролях-самцях масою  $4700 \pm 15$  г. Усім тваринам було проведено гостре травматичне пошкодження ахіллового сухожилля шляхом поперечного його надрізання по задній поверхні гострим скальпелем на  $\frac{1}{2}$  діаметра на 1 см проксимальніше від місця прикріплення до п'яткової кістки, з наступним введенням у зону ушкодження тваринам I-IV груп по 0,5 мл АПЗТ, отриманої внаслідок центрифугування, яка відрізнялася залежно від методу обробки: варіювали число обертів на хвилину та тривалість центрифугування. Для цього у тварин I-IV груп з яремної вени брали по 5 мл крові та піддавали її центрифугуванню без додавання антикоагулянта цитрата натрію, що дозволяло одержати аутологічний тромбоцитарний гель. Зразки крові тварин I групи центрифугували на швидкості 1500 об/хв протягом 5 хв.; II групи – при 2600 об/хв протягом 12 хв.; III групи проводили центрифугування при 1500 об/хв протягом 10 хв.; IV групи – подвійне центрифугування: при 1500 об/хв протягом 10 хв., а потім при 4000 об/хв – 10 хв. Тваринам V групи (контроль) у товщу ушкодженого сухожилля вводили 0,5 мл ізотонічного розчину (0,9%) хлориду натрію.

Розподіл тварин у групах порівняння та за строками спостереження: I група включала 6 тварин: по 2 кролі на строки 21, 45 та 60 діб, II група – 5 тварин: по 2 кролі на строки 21 та 60 діб та один – 45 діб, III група – 3 тварини: по 2 на строк 21 доба та один – 45 діб, IV група – 2 тварини: по одному кролю на строки 21 та 45 діб, V група – 2 кролі на строк 60 діб.

Утримання тварин здійснювали відповідно до “Санітарних правил створення, обладнання та утримання експериментально-біологічних клінік (віваріїв)” від 06.04.1973 р. та доповнень від 04.12.1978 р. до наказу МОЗ СРСР № 163 від 10.03.1966 р. Під час дослідження керувалися “Європейською конвенцією щодо захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальними та іншими науковими цілями” (Страсбург, 18.03.1986 р.), а також “Загальними принципами експериментів на тваринах”, схваленими II Національним конгресом з біоетики (20.09.2004 р., м. Київ, Україна).

Тварин виводили з експерименту шляхом повітряної емболії судин малого кола кровообігу в стані глибокого тіопенталового наркозу. З метою попередження артефіційної контракції колагенових волокон сухожилля внаслідок фіксації перед видаленням фрагмента для гістологічного дослідження на 1,5 см проксимальніше та дистальніше від місця тенотомії у положенні розгинання стопи сухожилля щільно фіксували лігатурами до дерев'яної палички довжиною 4 см та розмірами перетину  $3 \times 3$  мм. Закріплене в такий спосіб сухожилля фіксували у 10% розчині формаліну. Після фіксації для гістологічної проводки вирізали поздовжні шматочки товщиною 3 мм у сагітальній площині перпендикулярно до площини тенотомії сухожилля, виконували заливання шматочків у целоїдин, одержували зрізи товщиною 10 мкм, які фарбували гематоксиліном і еозином та гематоксиліном і пікрофуксином за ван Гізоном. Гістологічні дослідження проводили на мікроскопах МБС-2 та Olympus CX-41.

Після вивчення морфологічних змін пошкоджених сухожилів у тварин усіх груп порівняння визначено морфометричні показники, які відображають стан сухожилля у процесі його репаративної регенерації. При проведенні оцінки та вимірюванні параметрів визначених показників застосовували “сліпий” метод, тобто дослідник, вивчаючи та оцінюючи морфологічні зміни, заздалегідь не знав умов експерименту та строку спостереження певної тварини.

Оскільки патоморфологічні зміни в частково тенотомованих сухожиллях в різних групах тварин за різних строків спостереження були подібними і мали деякі кількісні відмінності, для об'єктивізації результатів проведено аналіз патогістологічних змін за двома морфометричними показниками:

- вираженість контурів сухожильного регенерату на місці часткової тенотомії – непараметричний

показник, він дає оцінку структурних відмінностей тканини, що заповнює місце тенотомії, утворене внаслідок контракції сухожильних волокон в обох кінцях сухожилля при тенотомії, які прилягають до площини розрізу. Частоту випадків певного ступеня вираженості цього показника та міжгрупові відмінності оцінювали за критерієм  $\chi$ -квадрат із поправкою Йейтса на малий обсяг вибірки;

- відносна площа ділянок проліферації незрілих фібробластів серед загальної площі тканини сухожилля у процентах. Ділянки проліферації включали як сам незрілий сухожильний регенерат, так і шматки, де в межах фасцикулів була збільшена кількість незрілих фібробластів, і не включали шматки сухожильної тканини, що не відрізнялася від диференційованої нормальної тканини сухожилля. Оцінка проводилася в окресленій ділянці сухожилля довжиною 20 мм.

Протокол дослідження затверджено локальним комітетом із біоетики ДУ “Інститут травматології та ортопедії НАМН України” (протокол № 2 від 9.04.2019 р.).

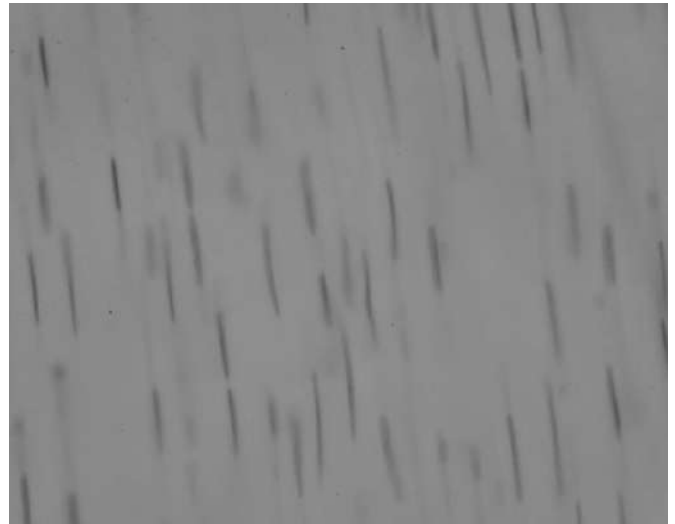
## Результати та їх обговорення

**Патоморфологічні зміни сухожилля після часткової тенотомії.** На поздовжніх зрізах ушкодженого сухожилля визначалися ділянки морфологічних змін різного ступеня вираженості. У неушкодженій частині сухожилля, що розташована поза ділянкою надрізу, переважала тканина, що мало відрізнялася від нормальної, структура останньої відповідала щільній оформленій сполучній тканині: товсті сухожильні волокна, що проходили паралельно та подекуди відзначалися незначною хвилястістю (рис. 1).



**Рис. 1.** Гістологічна будова неушкодженої тканини сухожилля поза ділянкою гострої травми на поздовжньому зрізі. Гістопрепарат сухожилля кроля IV групи, строк спостереження 45 діб. Фарбування гематоксиліном та еозином. Загальне збільшення  $\times 75$

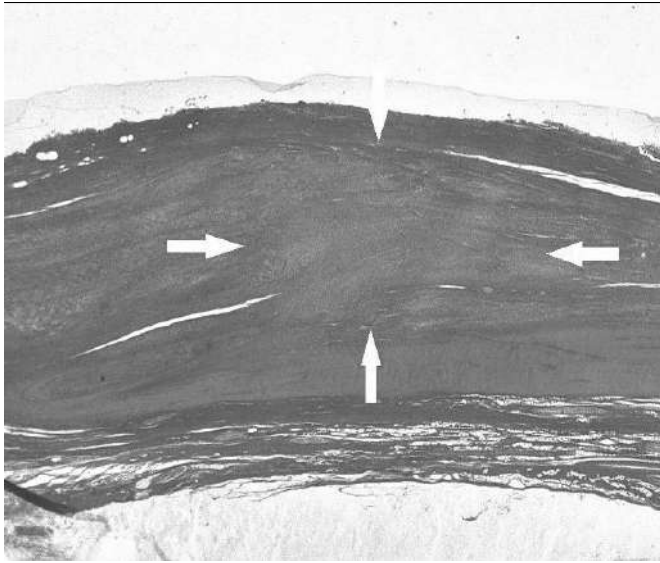
Між товстими, однорідного виду пучками залягали сухожильні клітини – теноцити, що найбільшою мірою відповідали фіброцитам – зрілим формам фібробластів. Ядра теноцитів, дуже видовжені, паличкоподібні, в ділянках хвилястості також хвилясті, повторювали хід товстих пучків колагенових волокон. Поперечний розмір колагенових пучків сухожилля більш ніж у 3-4 рази перевищував поперечний розмір ядер теноцитів (рис. 2).



**Рис. 2.** Гістологічна будова неушкодженої тканини сухожилля поза ділянкою гострої травми: ядра теноцитів мають паличкоподібну форму. Гістопрепарат сухожилля кроля IV групи, строк спостереження 21 доба. Фарбування гематоксиліном та еозином. Загальне збільшення  $\times 300$

На гістопрепаратах сухожиль кроликів зі строка спостереження 21 та 45 діб після тенотомії видно, що ділянка травматичного пошкодження тканини сухожилля мала неправильно-клиноподібну або веретеноподібну форму, була заповнена незрілою гіперцелюлярною фіброзною тканиною (рис. 3), причому в строк 21 доба ділянка регенерату добре виявлялася серед волокон малозміненої сухожильної тканини у всіх 7 випадках, а в строк 45 діб – у двох випадках з п'яти. Незріла фіброзна тканина регенерату утворювала короткі та довгі тонковолокнисті колагенові пучки, орієнтовані в різних напрямках, які перепліталися та завихрювалися (рис. 4) і не вказували характерної анізотропії при дослідженні у поляризованому світлі (рис. 5). Клітини, що розташовані між тонкими колагеновими пучками, гістологічно відповідали юним фібробластам, містили овальні та веретеноподібні ядра, які відрізнялися за формою від ядер зрілих теноцитів нормальної сухожильної тканини. Серед клітин сухожильного регенерату, що заповнює дефект, порівняно часто траплялися фігури мітозів фібробластів: максимально

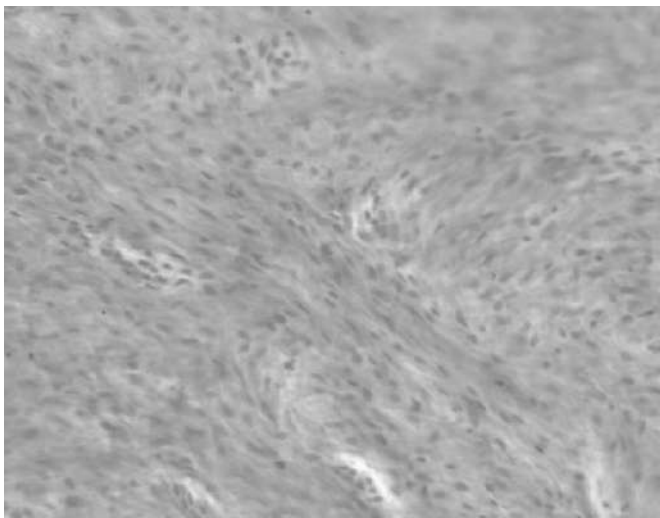
до десяти у 10 полях зору при великому збільшенні мікроскопа (рис. 6).



**Рис. 3.** Загальний вигляд фібробластичного регенерату (кордони позначено стрілками) на місці часткової тенотомії.

Гістопрепарат сухожилля кроля II групи, строк спостереження 21 доба.

Фарбування гематоксиліном та пікрофуксином за ван Гізоном. Загальне збільшення  $\times 12$



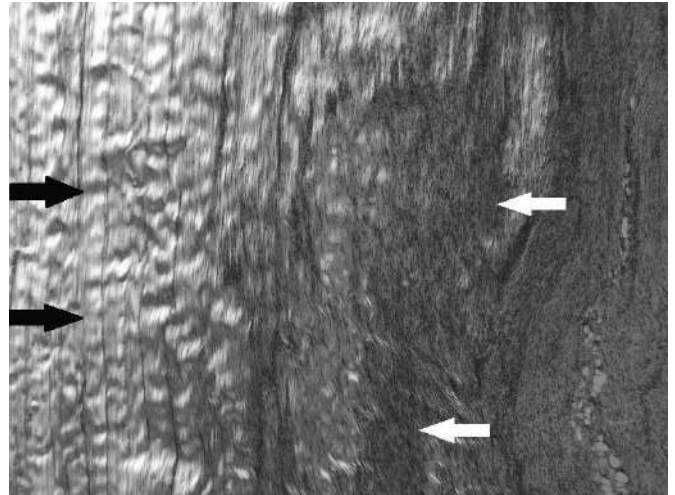
**Рис. 4.** Фібробластичний регенерат тканини сухожилля, побудований з юних фібробластів та тонких колагенових волокон, що переплітаються.

Гістопрепарат сухожилля кроля I групи, строк спостереження 21 доба.

Фарбування гематоксиліном та пікрофуксином за ван Гізоном. Загальне збільшення  $\times 150$

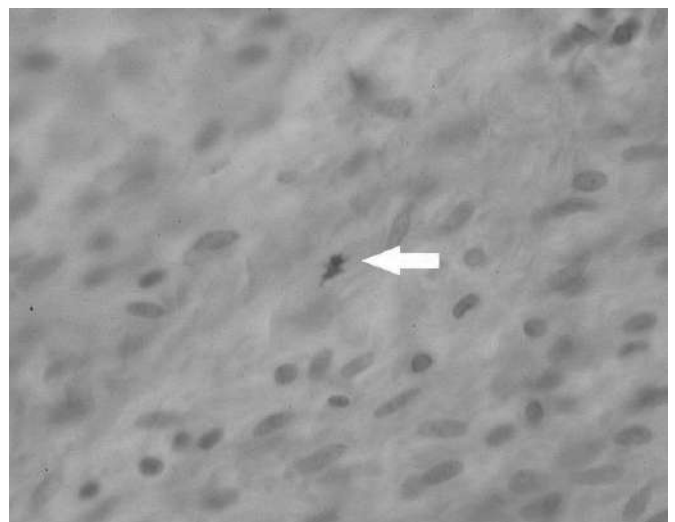
У ділянках тенотомованого сухожилля, які прилягали до регенерату, тканина сухожилля за будовою відрізнялася як від непошкодженої сухожильної тканини, так і від тканини регенерату, що утворився на

місці тенотомії. Сухожильні волокна були порівняно товсті, хоча й поступалися за розмірами поперечника волокнам нормального сухожилля, проте були товщими за колагенові волокна регенерату, що утворився на місці тенотомії (рис. 7).



**Рис. 5.** Пучки колагенових волокон сухожильного регенерату (позначено білими стрілками) не виявляють сильної анізотропії порівняно з неушкодженими ділянками сухожилля (позначено чорними стрілками). Гістопрепарат сухожилля кроля I групи, строк спостереження 21 доба.

Фарбування гематоксиліном та еозином, поляризаційна мікроскопія. Загальне збільшення  $\times 30$



**Рис. 6.** Мітоз у фібробласти (позначено стрілкою) незрілого сухожильного регенерату. Гістопрепарат сухожилля кроля III групи, строк спостереження 21 доба.

Фарбування гематоксиліном та пікрофуксином за ван Гізоном.

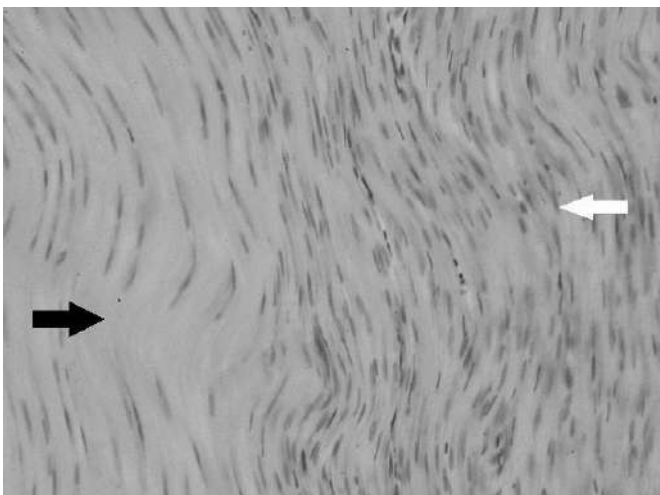
Загальне збільшення  $\times 300$

Клітини, що залягають між колагеновими пучками в таких ділянках, мали неоднорідну форму: поряд із фібробластоподібними клітинами з овальни-

ми та веретеноподібними ядрами (юні фібробласти, попередники теноцитів) часто траплялися ядра, що більшою мірою відповідали ядрам нормальних теноцитів, тобто мали паличкоподібну форму. При цьому хаотичні переплетення та завихрення пучків колагенових волокон, властиві незрілому сухожильному регенерату, в таких ділянках не спостерігалися (рис. 8).

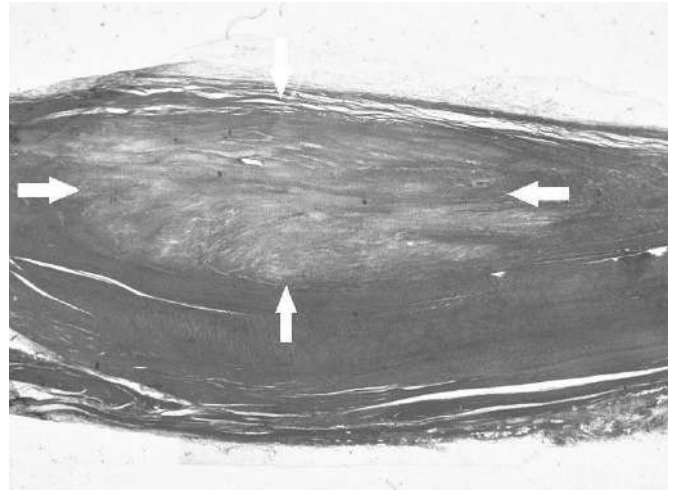


**Рис. 7.** Колагенові пучки у ділянці тканини сухожилля, що прилягає до регенерату на місці тенотомії. Найменш ушкоджена тканина сухожилля позначена стрілкою. Гістопрепарат сухожилля кроля II групи, строк спостереження 21 доба. Фарбування гематоксиліном та еозином. Загальне збільшення  $\times 30$

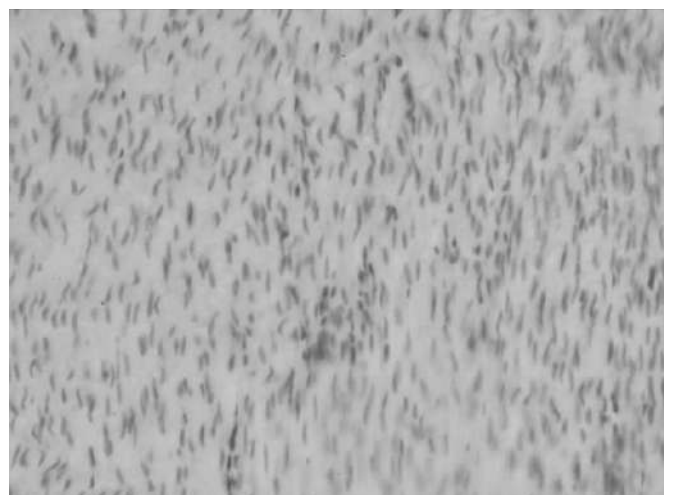


**Рис. 8.** Неоднорідний клітинний склад сухожилля у ділянці, прилеглої до регенерату: з непошкодженою тканиною (чорна стрілка) межує ділянка з поліморфним складом теноцитів та юних фібробластів (біла стрілка). Гістопрепарат сухожилля кроля IV групи, строк спостереження 21 доба. Фарбування гематоксиліном та еозином. Загальне збільшення  $\times 150$

У сухожиллях тварин із терміном спостереження 45 та 60 днів характер патологічних змін у різних групах спостереження був неоднорідним: у деяких групах порівняння осередок регенерату з незрілої сухожильної тканини був добре вираженим (рис. 9), в інших – не визначався, проте гістологічна будова сухожильної тканини з паралельним ходом пучків мала особливості: поряд із пучками, що практично повністю відповідали незмінній сухожильній тканині, доволі великі ділянки мали будову, де всередині фасцикулів типової будови містилось багато незрілих фібробластів (рис. 10).

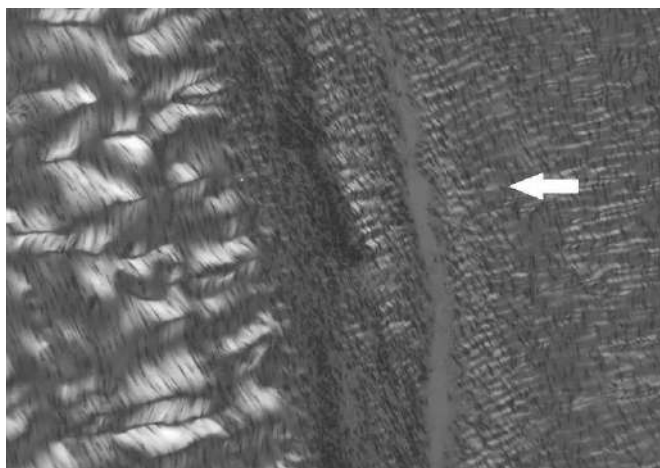


**Рис. 9.** Осередок регенерату з порівняно тонкими сухожильними пучками (окреслений стрілками) у тканині часткової тенотомії сухожилля. Гістопрепарат сухожилля кроля III групи, строк спостереження 45 днів. Фарбування гематоксиліном та пікрофуксином за ван Гізоном. Загальне збільшення  $\times 12$



**Рис. 10.** Переважання юних фібробластів у ділянці, прилеглої до сухожильного регенерату на місці часткової тенотомії. Гістопрепарат сухожилля кроля V групи, строк спостереження 60 днів. Фарбування гематоксиліном та еозином. Загальне збільшення  $\times 150$

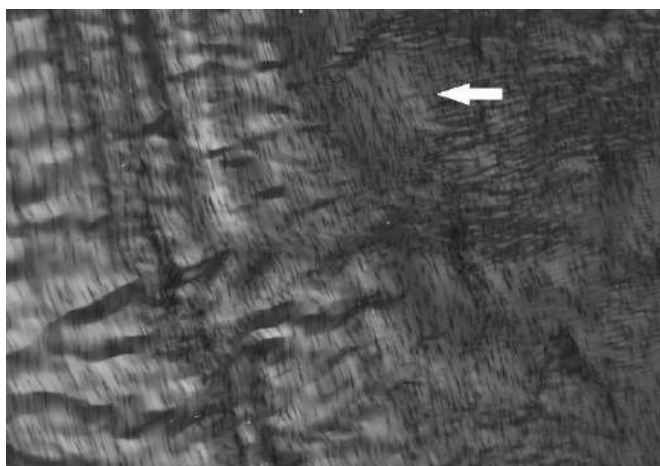
Ознаки поступового дозрівання тканини сухожильного регенерату добре визначаються у віддалені строки після тенотомії в разі застосування поляризаційної мікроскопії гістологічних зрізів (рис. 11). Порівняно з ділянками неушкодженої сухожильної тканини, де колагенові пучки товсті, однорідного вигляду, щільні та виявляють сильну анізотропію у поляризованому світлі, ділянка сухожильного регенерату містить тонкі, дрібнозвивисті колагенові волокна, які набувають більшої анізотропії порівняно з аналогічною тканиною у попередній строк спостереження (див. рис. 5). На 60-ту добу після тенотомії товщина сухожильних волокон та їхня анізотропія ще зростають (рис. 12).



**Рис. 11.** Ознаки відновлення анізотропії тонких сухожильних волокон регенерату, які мають звивистий характер (позначені стрілкою).

Гістопрепарат сухожилля кроля I групи, строк спостереження 45 діб.

Фарбування гематоксилином та еозином, поляризаційна мікроскопія. Загальне збільшення  $\times 75$



**Рис. 12.** Подальше потовщення та посилення анізотропії сухожильних волокон регенерату (позначено стрілкою). Гістопрепарат сухожилля кроля I групи, строк спостереження 60 діб.

Фарбування гематоксилином та еозином, поляризаційна мікроскопія. Загальне збільшення  $\times 75$

### Статистичні відмінності морфометричних показників репаративної регенерації при частковій тенотомії сухожилля в умовах застосування аутологічної плазми, збагаченої тромбоцитами.

Результати порівняння частот та середніх величин морфометричних показників в окремих групах у певні строки спостереження (див. табл. 1) показали, що у тварин, у яких не проводили аплікацію АПЗТ (I група), через 60 діб після тенотомії все ще добре виявлялися контури сухожильного регенерату, побудованого з незрілої фіброзної тканини, а відносна площа ділянок проліферації незрілих фібробластів складала близько третини площі тканини сухожилля в окресленій ділянці зрізу, іншу частину площі зрізу становила малозмінена тканина сухожилля. В окремих групах експериментів із використанням АПЗТ, одержаної за різних умов, виявилось, що у термін 21 доба контури сухожильного регенерату на місці тенотомії завжди добре визначались, у термін 45 діб контури сухожильного регенерату були добре виражені лише у тварин II та III груп, в інших групах – не визначались. У термін 60 діб у групі, де застосовували АПЗТ (II), в обох випадках контури сухожильного регенерату не були вираженими.

У тварин всіх чотирьох груп, де застосовували АПЗТ, в термін 21 доба після часткової тенотомії відносна площа ділянок проліферації незрілих фібробластів складала 60-75% від площі тестової ділянки сухожилля. У термін спостереження 45 діб у тварин деяких піддослідних груп (II та III) відносна площа ділянки проліферації фібробластів становила від 50 до 100%. У термін 60 діб в одній із груп (II), де застосовували АПЗТ, середня частка площі ділянок проліферації фібробластів складала 10%.

Результати міжгрупових статистичних порівнянь за двома показниками вміщено у таблиці.

Аналіз результатів статистичного порівняння частоти випадків, де контури сухожильного регенерату були добре чи слабо окреслені, показав, що лише в групах I, III та IV у частині спостережень межі сухожильного регенерату є невираженими (40-50% випадків), в інших випадках у цих групах контури регенерату були добре виражені; проте відмінності частот в окремих групах порівняння при оцінці за критерієм  $\chi^2$  були невірними. Середні величини показника “відносна площа ділянок проліферації юних фібробластів” у групах тварин, де застосовували АПЗТ, склали від 50 до 70%, проте міжгрупові відмінності середніх величин виявилися статистично невірними при оцінці за критерієм Стьюдента.

Загоєння сухожилля після механічного розсічення відбувається у три фази, ознаки кожної з яких частково перекривають одна одну. Фаза запалення

Таблиця 1

**Результати статистичного порівняння частоти та середніх величин морфометричних показників, що використані при оцінці стану тканин в осередку пошкодження та репарації сухожилля після тенотомії (строки спостереження після часткової тенотомії 21-45-60 діб)**

Назва показника	Загальна характеристика показника, градації вираженості та одиниці виміру	Частота випадків певної градації, середні величини та відмінності в групах порівняння					
		Група V Тенотомія, ізотонічний розчин	Група I АПЗТ (1500 об/хв, 5 хв.)	Група III АПЗТ (1500 об/хв, 10 хв.)	Група II АПЗТ (2600 об/ хв, 12 хв.)	Група IV АПЗТ (1500 об/ хв, 5 хв., 4000 об/ хв, 10 хв.)	
Вираженість контурів регенерату тканини сухожилля на місці часткової тенотомії	Непараметричний						
	Низький ступінь: контури сухожильного регенерату виразно не визначаються	0/2	3/6	0/3	2/5	1/2	
	Високий ступінь: контури сухожильного регенерату добре визначаються	2/2	3/6	3/3	3/5	1/2	
	Порівняння частот градацій у групах V та I °	$\chi^2=0,18$ НВ					
	Порівняння частот у групах V та III	НВ					
	Порівняння частот у групах V та II	$\chi^2=0,018$ НВ					
	Порівняння частот у групах V та IV	$\chi^2=0,000$ НВ					
	Порівняння частот у групах I та IV		$\chi^2=0,667$ НВ				
Назва показника	Загальна характеристика показника, градації вираженості та одиниці виміру	Частота випадків певної градації, середні величини та відмінності в групах порівняння					
		Група V Тенотомія, ізотонічний розчин	Група I АПЗТ (1500 об/хв, 5 хв.)	Група III АПЗТ (1500 об/хв, 10 хв.)	Група II АПЗТ (2600 об/ хв, 12 хв.)	Група IV АПЗТ (1500 об/ хв, 5 хв., 4000 об/ хв, 10 хв.)	
		Параметричний: число варіант n, групове середнє значення $\bar{X}$ , стандартна помилка середньої арифметичної $S_{\bar{x}}$	2 35,00±15,00	6** 59,17±8,21	3 70,00±10,00	5 54,00±18,60	2 55,00±5,00
		Порівняння середніх величин у групах V та I	k=6*** t=1,458**** НВ				
		Порівняння середніх величин у групах V та III	k=3 t=2,049 p<0,2 (НВ)				
		Порівняння середніх величин у групах V та II	k=5 t=0,592 НВ				
		Порівняння середніх величин у групах V та IV	k=2 t=1,265 НВ				
		Порівняння середніх величин у групах I та IV		k=6 t=0,275 НВ			
Відносна площа ділянок проліферації юних фібробластів	Порівняння середніх величин у групах III та IV		k=3 t=1,116 НВ				
	Порівняння середніх величин у групах II та IV			k=5 t=0,032 НВ			

Примітки:

\* – число випадків цієї градації показника / загальне число врахованих випадків при оцінюванні; \*\* – число випадків, середній параметр, стандартна помилка середньої; \*\*\* – число ступенів свободи при порівнянні середніх двох груп порівняння ( $k=n_1+n_2-2$ ); \*\*\*\* – фактичне значення t-критерію Стьюдента при порівнянні середніх величин двох груп; ° – визначення ймовірності помилки при оцінці різниці частот за методом  $\chi$ -квадрат з поправкою Йейтса.

починається у перші години після травми і триває кілька днів, у цей час на місці травми та у прилеглих ділянках тканини виникають фібрoneкрози, гіперемія, посилюється проникність стінок судин, накопичуються клітини запального інфільтрату, відбувається фагоцитоз [2, 3]. Наприкінці цієї фази складаються умови для розгортання наступної фази проліферації, яка починається через 2-3 доби після пошкодження та триває кілька тижнів (до 6) тижнів [13]. Вподовж цього часу на місці травми активно розмножуються недиференційовані клітини епітендинію та перитендинію, наростає біосинтез колагену III типу. Під час наступної фази перебудови (в ній виділяють стадії консолідації та дозрівання) у сухожилльному регенераті суттєво зменшується кількість клітин та поступово гальмується біосинтез колагену та глюкозаміногліканів. Стадія консолідації триває від 6 до 10 тижнів після травми, під час якої новоутворені колагенові волокна розташовуються вздовж напрямків натягу та зростає частка колагену I типу [14]. Від 10-го тижня і аж до року після травми триває стадія дозрівання, за якої спадає активність синтезу колагену та зменшується ступінь васкуляризації [15].

Загоєння сухожилля може відбуватися за рахунок розмноження внутрішніх клітин (перитендинію та епітендинію) або зовнішніх клітин (сухожилльних оболонки та синовіальної оболонки) [16]. Бластні форми епітенона ініціюють репаративний процес внаслідок проліферації та міграції цих клітин у ділянку пошкодження [17]. Загоєння сухожилля може бути досягнуто лише за рахунок клітин епітенона, навіть без зовнішніх зрощень за участю клітин та судин [2]. Важливо, що теноцити перитендинію роблять більший внесок у репаративний процес і продукують більшу кількість більш зрілого колагену, ніж клітини епітенона. Якщо клітини епітенона продукують колаген раніше, то клітини перитендинію – пізніше [18]. На відносний внесок клітин кожного типу може впливати вид травми, анатомічне розташування, наявність сухожилльної оболонки, сила натягнення внаслідок рухів після відновлення.

Клітини, що врастають з оболонки сухожилля, продукують менше колагену та глюкозаміногліканів, ніж клітини епітенона та перитендинію, однак фібробласти, що врастають з оболонки сухожилля згинача, проліферують швидше. “Внутрішнє” загоєння характеризується кращими наслідками для біомеханіки сухожилля та меншою кількістю ускладнень, особливо щодо збереження оптимальних умов ковзання [19].

У нашій роботі патоморфологічне дослідження сухожилля після часткової тенотомії показало, що на місці поперечного розсічення колагенових пучків щільної оформленої сполучної тканини, з якої складається тканина сухожилля, виникає первинний дефект, останній утворюється внаслідок розходжен-

ня пучків колагенових волокон по обидва боки від площини розсічення. У найкоротший термін спостереження в нашому матеріалі (21 доба після тенотомії) репаративна реакція у тканині сухожилля, перебувала в стадії проліферації та була настільки добре вираженою, що дефект був практично заповнений регенератом із незрілої сполучної тканини.

Репаративна реакція тканини сухожилля не обмежувалася безпосередньо краями дефекту, але включала накопичення незрілих фібробластів в усіх стромальних проміжках та оболонках кінців сухожилля після тенотомії, тобто в перитендинії на деякій відстані від локусу безпосереднього дефекту. Ця реакція незрілих клітин у тканині сухожилля добре виражена в краях сухожилля, що межують із дефектом, але поширюється на певну відстань від країв ділянки тенотомії. Усе ж найбільший внесок у формування сухожилльного регенерату, ймовірно, роблять клітини перитендинію, власне стромальні клітини сухожилля, що проходять між сухожилльними пучками та фасцикулами. Хаотичний характер розташування тонких пучків колагенових волокон у сухожилльному регенераті, що заповнює первинний дефект, ймовірно, пов'язаний із відсутністю натягнення цих структур у ділянці тенотомії, яке є обов'язковим елементом їхнього функціонування. Заповнення дефекту тканини сухожилля регенератом з юних фібробластів встановлює зв'язок між кінцями сухожилля, що прилягають до дефекту, – відтак починається відновлення функції сухожилля, яке включає його періодичне натягнення та розслаблення. У більш пізні строки спостереження, власне у стадію консолідації (45, 60 діб), сухожилльний регенерат стає менш помітним, проте паралельність пучків колагенових волокон та характерний одноманітний вигляд теноцитів, що залягають між ними та властиві тканині неушкодженого сухожилля, в ці строки ще не досягаються. Природно, що процеси дозрівання клітин та волокон сухожилля, які відбуваються під впливом та в процесі функціонування цієї анатомічної структури, відтерміновані до більш пізніх строків спостереження.

У кількох роботах, присвячених впливу окремих факторів росту на процес загоєння сухожилля, було встановлено, що такий фактор, як морфогенетичний протеїн-2, виділений із хрящової тканини, оптимізує цей процес при моделюванні на ахіллового сухожилля у кроля [12]. Подібний вплив на регенерацію сухожилля справляють фактори 5, 6, 7 – члени сімейства генів TGF- $\beta$  [20], а також судинно-ендотеліального фактора росту [21].

Виявлені нами особливості формування та дозрівання сухожилльного регенерату на місці часткової тенотомії були принципово однаковими в усіх групах порівняння, представлених у нашому дослі-



дженні. Варіації розмірів сухожильних регенератів, що заповнюють дефект, протяжності ознак репаративної реакції клітин перитендинію вздовж кінців сухожилля, прилеглих до дефекту, мали місце і втілювалися у варіації значень таких морфометричних показників, як вираженість контурів сухожильного регенерату на місці часткової тенотомії та відносна площа ділянок проліферації юних фіброblastів.

Результати, одержані в межах проведеного дослідження, не дають достатніх підстав вважати міжгрупові відмінності частот та середніх величин статистично вірогідними і такими, що є остаточно встановленими. Проте можна відзначити, що у більш ранні строки (21 доба після тенотомії) практично в усіх групах тварин помітні контури сухожильного регенерату, що заповнює дефект, утворений внаслідок розсічення сухожильних пучків, у термін 45 діб наявні варіації значення цього показника, а в термін 60 діб у групі, де вводили АПЗТ, контури регенерату тканини сухожилля не визначаються, при цьому в групі, де АПЗТ не застосовували, сухожильний регенерат був добре помітним.

Що стосується показника, який відображає поширеність ділянок проліферації незрілих фіброblastів клітин безпосередньо у тканині кінців сухожилля при тенотомії, можна відзначити, що в групі IV, де застосовували найбільш інтенсивний режим центрифугування крові при одержанні АПЗТ, порівняно з іншими групами, де використовували менш інтенсивний режим (групи I, II, III), у термін 21 та 45 діб середні величини є найнижчими. Отже, можна вважати, що в групах, де здійснювали аплікації АПЗТ, процес дозрівання сухожильних регенератів та супутньої клітинної реакції в кінцях розсічених сухожильних пучків, ймовірно, відбувається більш швидкими темпами у порівнянні як із контрольною групою тварин (без аплікації АПЗТ), так і з групами, де АПЗТ одержували, використовуючи менш інтенсивні режими центрифугування крові.

## Висновки

1. Часткова тенотомія ахіллового сухожилля у кролів призводить до утворення дефекту в ділянці розсічення пучків колагенових волокон, що має клиноподібну або веретеноподібну форму. Дефект у межах трьох наступних тижнів після механічної травми заповнюється незрілим клітинно-волокнистим регенератом, пучки останнього не мають поздовжньо-паралельної орієнтації, а утворюють хаотичні переплетення.

2. Репаративна реакція тканини сухожилля після часткової тенотомії в експерименті відбувається внаслідок проліферації юних клітин-фіброblastів насамперед перитендинію і поширюється на деяку

відстань від країв сухожильних пучків, підданих тенотомії.

3. Зі збільшенням тривалості строків спостереження (45, 60 діб після часткової тенотомії) у регенераті, що заповнює дефект сухожилля, відбувається органотипова перебудова хаотично розташованих пучків колагенових волокон у напрямку відновлення їхньої паралельності та дозрівання фіброblastів, які набувають форми зрілих, дефінітивних теноцитів.

4. Непараметричний показник “вираженість контурів сухожильного регенерату” варіює у групах порівняння за частотою випадків наявності чи відсутності ознаки: в контрольній групі дефект є добре вираженим навіть у віддалені строки після тенотомії, а в групах, де застосовували АПЗТ, із збільшенням строків спостереження (45, 60 діб) переважають випадки, де локус пошкодження чітко не виявляється. Ці результати дослідження виявилися невірогідними за наявної кількості випадків спостереження.

5. Показник “відносна площа ділянок проліферації незрілих фіброblastів” значно варіює, але у більшості груп порівняння, де застосовували АПЗТ, має тенденцію до зменшення із збільшенням строків спостереження, причому за однакових строків (21, 45 діб) найнижчі середні параметри знайдено в групі з найбільш інтенсивним режимом одержання АПЗТ. Результати порівняння середніх величин у різних групах спостереження є статистично невірогідними за наявної кількості випадків.

6. Застосування АПЗТ для аплікації в локус часткової тенотомії ахіллового сухожилля, ймовірно, сприяє більш швидкому, ніж у контролі, дозріванню клітин-фіброblastів, які утворюють сухожильний регенерат у дефекті, що виник внаслідок тенотомії, а також дозріванню клітин, що проліферують, у перитендинії в кінцях сухожильних пучків на деякій відстані від площини пересічення – це може свідчити на користь прискорення фаз процесу репаративної регенерації сухожилля після тенотомії, за умов уведення АПЗТ.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів під час підготовки статті.

## Література

1. Sharma P. Tendon Injury and Tendinopathy: Healing and Repair / P. Sharma, N. Maffulli // J. Bone and Joint Surg. – 2005. – Vol. 87-A, № 1. – P. 187–202. DOI:10.2106/JBJS.D.01850.
2. Flexor tendon repair / R.H. Gelberman, P.R. Manske, W.H. Akeson [et al.] // J. Orthop Res. – 1986. – Vol. 4, № 1. – P. 119–128. DOI: 10.1002/jor.1100040116.
3. Wang E.D. Tendon Repair / E.D. Wang // J. Hand Ther. – 1998. – Vol. 11, № 2. – P. 105–110. DOI: 10.1016/S0894-1130(98)80006-9.
4. McMinn R.M.H. Tendon / R.M.H. McMinn // Tissue repair. – New York and London: Academic Press, 1969. – P. 128–138.

5. Mechanical load stimulates expression of novel genes in vivo and in vitro in avian flexor tendon cells / *A.J. Banes, G. Horesovsky, C. Larson* [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage*. – 1999. – Vol. 7, № 1. – P. 141–153. DOI: 10.1053/joca.1998.0169.
6. Effect of curcumin on tendon healing: an experimental study in a rat model of Achilles tendon injury / *A. Güleç, Y. Türk, B.K. Aydın* [et al.] // *Int. Orthop.* – 2018. – Vol. 42, № 8. – P. 1905–1910. DOI: 10.1007/s00264-018-4017.
7. Сучасні погляди на застосування плазми, багатої факторами росту, в ортопедії та травматології (огляд літератури) / *О.О. Коструб, І.М. Зазірний, Р.І. Блонський* [та ін.] // *Вісник ортопед., травматол. та протезув.* – 2010. – № 2. – С. 82–87.
8. Вплив аутологічних мультипотентних стромальних клітин кісткового мозку, фібробластів та плазми, багатої на фактори росту на відновлення структури сухожилля при його дегенеративно-дистрофічному ураженні в експерименті / *А.Т. Бруско, О.О. Коструб, В.І. Грищенко* [та ін.] // *Вісник ортопед., травматол. та протезув.* – 2010. – № 2. – С. 5–11.
9. *Коструб О.О.* Клітинна терапія при дегенеративних ушкодженнях сухожилля / *О.О. Коструб, Р.І. Блонський*. – Київ : Здоров'я, 2011. – 151 с.
10. *Abramsson S.O.* Differential effects of insulin-like growth factor-1 on matrix and DNA synthesis in various regions and types of rabbit tendons / *S.O. Abramsson, S. Lohmander* // *J. Orthop. Res.* – 1996. – Vol. 14, № 3. – P. 370–376. DOI: 10.1002/jor.1100140305.
11. *Kang H.J.* Ideal concentration of growth factors in rabbits flexor tendon culture / *H.J. Kang, E.S. Kang* // *Yonsei Med. J.* – 1999. – Vol. 40, № 1. – P. 26–29. DOI: 10.3349/ymj.1999.40.1.26.
12. *Forslund C.* Improved healing of transected rabbit Achilles tendon after a single injection of cartilage-derived morphogenetic protein-2 / *C. Forslund, P. Aspenberg* // *Am. J. Sports Med.* – 2003. – Vol. 31, № 4. – P. 555–559. DOI: 10.1177/03635465030310041301.
13. *Oakes B.W.* Tissue healing and repair: tendons and ligaments / *B.W. Oakes* // Ed. Frontera W.R. *Rehabilitation of sports injuries: scientific basis*. – Boston : Blackwell Science. – 2003. – P. 56–98.
14. *Abramsson S.O.* Matrix metabolism and healing in the flexor tendon. Experimental studies on rabbit tendon / *S.O. Abramsson* // *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg., Hand Surg. Suppl.* – 1991. – Vol. 23. – P. 1–51. PMID: 1947826.
15. *Kakar S.* Differential cellular response within the rabbit tendon unit following tendon injury / *S. Kakar, U. Khan, D.A. McGrouther* // *J. Hand Surg. Br.* – 1998. – Vol. 23, № 5. – P. 627–632. PMID: 9821609.
16. *Potenza A.D.* Tendon healing within the flexor digital sheath in the dog / *A.D. Potenza* // *J. Bone and Joint Surg.* – 1962. – Vol. 44-A, № 1. – P. 49–64. PMID: 14038468.
17. *Manske P.R.* Flexor tendon healing / *P.R. Manske, R.H. Gelberman, P.A. Lesker* // *Hand Clin.* – 1985. – Vol. 1, № 1. – P. 25–34. PMID: 3912393.
18. Superficial repair of severed flexor tendons in synovial environment. An experimental, ultrastructural study on cellular mechanisms / *G. Lundborg, H.A. Hansson, F. Rank, B. Rydevik* // *J. Hand Surg. Am.* – 1980. – Vol. 5, № 5. – P. 451–461. DOI: 10.1016/S0363-5023(80)80075-X.
19. *Koob T.J.* Tendon – bridging the gap / *T.J. Koob, A.P. Summers* // *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* – 2002. – Vol. 133, № 4. – P. 905–909. PMID: 12485682.
20. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family / *N.M. Wolfman, G. Hattersley, K. Cox* [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol. 100, № 2. – P. 321–330. DOI: 10.1172/JCI119537.
21. Effect of vascular endothelial growth factor on rat Achilles tendon healing / *F. Zhang, H. Liu, F. Stile* [et al.] // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2003. – Vol. 112, № 6. – P. 1613–1619. DOI: 10.1097/01.PRS.0000086772.72535.A4.

### The Influence of Platelet-Rich Plasma Obtaining Conditions on the Dynamics of Morphological Changes and Some Reparative Reaction Indices After Acute Mechanical Trauma of Tendon in Experiment

*Hryborovskiy V.V.<sup>1</sup>, Kostруб O.O.<sup>1</sup>, Blonskiy R.I.<sup>1</sup>, Maliuk M.O.<sup>2</sup>, Hryborovska A.V.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>SI “Institute of Traumatology and Orthopedics of NAMS of Ukraine”, Kyiv

<sup>2</sup>National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

**Summary. Relevance.** A variety of growth factors affect the structure and function of the regenerating tendon tissue. It is still not known whether platelet-rich plasma obtaining conditions can impact the features of tendon tissues that regenerate after trauma. **Objective:** to estimate efficiency influence of autologous platelet-rich plasma (PRP), obtained under different conditions of blood centrifugation, on reparative regeneration of the Achilles tendon of rabbits after its partial damage. **Materials and Methods.** Partial tenotomy was performed on 18 rabbits by a cross-section of the Achilles tendon on ½ of its diameter, with the subsequent introduction in a damage zone of 0.5 ml PRP, received from centrifugation, varying in the number of revolutions and duration. Terms of observation were 21, 45 and 60 days. Histological and morphometric studies were carried out. **Results.** Tendon regeneration after partial tenotomy occurs due to the proliferation of young fibroblasts primarily in peritendineum and extends on some distance from edges of tenotomized fascicles. With increase in terms, reorganization of collagenic fibres fascicles with their thickness and parallelism restoration and tenocytes maturation occurs in the regenerate. The indicator “tendon

regenerate contours expressiveness" varies: in the control group, the defect is well expressed even in remote periods, and in groups where PRP was used, with increasing periods (45, 60 days), the cases where the damage locus is not clearly defined prevail. The indicator "relative area of proliferation of immature fibroblasts" in most groups where PRP was used tends to decrease with an increase in the observation time; the lowest average parameters were found in the group with the most intensive mode for obtaining PRP. **Conclusions.** The use of PRP for application in the tendon tenotomy locus probably contributes to more rapid than in control maturation of fibroblast cells forming the tendon regenerate in the defect.

**Key words:** tendon, acute trauma, experiment, platelet-rich plasma, regeneration, morphometrics.

**Влияние условий получения аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами, на динамику морфологических изменений и некоторые показатели репаративной регенерации сухожилия после острой механической травмы в эксперименте**

Григоровский В.В.<sup>1</sup>, Коструб А.А.<sup>1</sup>, Блонский Р.И.<sup>1</sup>, Малюк Н.А.<sup>2</sup>, Григоровская А.В.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>ГУ "Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины", г. Киев

<sup>2</sup>Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

**Резюме. Актуальность.** Разнообразные факторы роста влияют на структуру и функции ткани регенерирующего сухожилия. До сих пор не известно, оказывают ли условия получения аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами, на состояние тканей сухожилия, регенерирующего после травмы. **Цель исследования.** Установить эффективность влияния аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами (АПТ, platelet rich plasma, PRP), полученной при разных условиях центрифугирования крови, на репаративную регенерацию ахиллова сухожилия кроликов после его частичного повреждения. **Материалы и методы.** Частичные тенотомии выполнены на 18 кроликах путем поперечного надреза ахиллова сухожилия на  $\frac{1}{2}$  диаметра, с последующим введением в зону повреждения по 0,5 мл АПТ, полученной вследствие центрифугирования, варьирующего по числу оборотов и длительности. Сроки наблюдения 21, 45 и 60 суток. Выполняли гистологическое и морфометрическое исследования. **Результаты.** Регенерация сухожилия после частичной тенотомии происходит вследствие пролиферации юных фибробластов прежде всего в перитендинии и распространяется на некоторое расстояние от краев тенотомизированных пучков. С увеличением сроков в регенерате происходит перестройка пучков коллагеновых волокон с восстановлением их толщины и параллельности и созреванием теноцитов. Показатель "выраженность контуров сухожильного регенерата" варьирует: в контрольной группе дефект хорошо выражен даже в отдаленные сроки, а в группах, где применяли АПТ, с увеличением сроков (45, 60 суток) преобладают случаи, где locus повреждения четко не определяется. Показатель "относительная площадь участков пролиферации незрелых фибробластов" в большинстве групп, где применяли АПТ, имеет тенденцию к уменьшению с увеличением сроков наблюдения, наиболее низкие средние параметры выявлены в группе с наиболее интенсивным режимом получения АПТ. **Выводы.** Применение АПТ для аппликации в locus тенотомии сухожилия, вероятно, способствует более быстрому, чем в контроле, созреванию клеток-фибробластов, образующих сухожильный регенерат в дефекте.

**Ключевые слова:** сухожилие, острая травма, эксперимент, плазма, обогащенная тромбоцитами, регенерация, морфометрия.