

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАБОЛИЗМА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Проведено исследование активности коллагеназы, определены фракции гидроксипролина и гликозаминогликанов в сыворотке крови крыс с моделью дегенеративно-дистрофического поражения сухожилий, а также на фоне введения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) аутологического костного мозга.

Установлено, что у экспериментальных животных при данной патологии нарушаются показатели метаболизма соединительной ткани, а введение культуры МСК способствует нормализации метаболических процессов в сухожилиях.

Отмечено, что по сравнению с внутривенным, непосредственное введение культуры клеток в толщу дегенеративно-дистрофически измененного ахиллового сухожилия является более эффективным методом с точки зрения улучшения показателей метаболизма соединительной ткани.

Ключевые слова: коллагеназа, гидроксипролин, гликозаминогликаны, мезенхимальные стволовые клетки, поражение сухожилий.

ВВЕДЕНИЕ

Лечение больных с дегенеративным поражением сухожилий не имеет четкого патогенетического обоснования, а методы терапии являются низкоэффективными, так как не приводят к полному восстановлению структуры поврежденных областей соединительной ткани. Трудности лечения объясняются малочисленностью содержания клеточных элементов в тканях сухожилия вообще, и особенно при дегенеративных изменениях. В настоящее время перспективным путем лечения ортопедических больных, в том числе с поражениями суставов и сухожилий, является применение аутологичной плазмы, обогащенной факторами роста, фибробластов и МСК, которые активизируют репаративные процессы [1, 2, 3].

С целью изучения возможности использования культуры клеток (а именно – аутологических МСК) в лечении дегенеративно-дистрофических процессов в сухожилиях и влияния подобной терапии на метаболические процессы в соединительной ткани, нами было проведено экспериментальное исследование.

Известно, что сухожилие состоит из компактных параллельных пучков коллагеновых волокон, между которыми расположены ряды тендоцитов, а сами волокна удерживаются вместе протеогликанами. Таким образом, для биохими-

ческого исследования метаболических процессов, происходящих в соединительной ткани сухожилий в условиях дегенеративно-дистрофического поражения и на фоне введения стволовых клеток, являлось важным исследовать активность коллагеназы как фермента, который обладает протеолитической активностью в отношении коллагеновых волокон.

Гидроксипролин является нестандартной и таким образом маркерной аминокислотой, входящей в состав коллагена – фибриллярного белка, образующего основу коллагеновых волокон, поэтому в задачи эксперимента входило также изучить соотношение свободной и белково-связанной фракций гидроксипролина, биохимических маркеров, указывающих на преобладание в организме процессов синтеза или распада коллагена. Также целесообразным для нашего исследования было определить содержание гликозаминогликанов (ГАГ) – высокомолекулярных углеводно-белковых соединений – еще одного важнейшего компонента соединительной ткани в целом и сухожилий в частности [4].

Цель работы: изучить показатели метаболизма соединительной ткани на фоне внутривенного или непосредственного введения в толщу сухожилия аутологических МСК у животных с моделью дегенеративного повреждения сухожилий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были выполнены на 45 половозрелых крысах-самцах, массой 300 ± 12 г, которых содержали на стандартном пищевом рационе. Животные были разделены на 3 группы: в 1-й группе – 21 животное, во второй – 14 крыс, в контрольной группе было 10 животных.

Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с требованиями биоэтики и принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей [5].

У всех крыс моделировали дегенеративно-дистрофическое поражение ахиллового сухожилия за разработанным методом [1]. Через 7 дней после получения дегенеративно-дистрофического поражения разово вводили:

- в толщу ахиллова сухожилия крыс, на 0,25 см проксимальнее пяточного холма – 0,1 мл культуры МСК аутологического костного мозга, взятого из крыла подвздошной кости (концентрация – 0,25·10⁶ клеток в 1 мл) – I группа;
- внутривенно – 0,1 мл культуры МСК аутологического костного мозга, взятого из крыла подвздошной кости (концентрация – 0,25·10⁶ клеток в 1 мл) – II группа;
- животным контрольной группы – 0,1 мл физиологического раствора.

Использовали культуры МСК аутологического костного мозга, разработанные по методикам отдела криобиологии репродуктивных систем Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков) [6].

Из опыта крыс выводили путем декапитации на 7, 21 и 45 сутки.

В сыворотке крови этих животных исследовали следующие показатели: активность коллагеназы, фракции гидроксипролина и ГАГ.

Активность коллагеназы определяли по Lindy [7]. Фракции гидроксипролина выделяли по методу Frey [8]. Гидроксипролин (ГП) во фракциях определяли по Stegemann [9], а общее содержание ГАГ – по методу Кляцкина С.А. и Лифшиц Р.И. [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Биохимические показатели, полученные при исследовании сыворотки крови, свидетельствуют о том, что в группе животных, которым вводили в толщу ахиллова сухожилия 0,1 мл культуры МСК аутологического костного мозга (I группа), на 7 сутки после трансплантации клеток активность коллагеназы достигает $5,30 \pm 0,11$ мкмоль/л·ч при норме $2,80 \pm 0,15$ мкмоль/л·ч, то есть возрастает до 189% по отношению к физиологической норме, а по отношению к активности этого фермента в контрольной группе животных – до 108% (табл. 1, рис. 1).

Наряду с ростом активности коллагеназы увеличивается и концентрация свободной фракции гидроксипролина – биохимического маркера распада коллагена. Концентрация аминокислоты в эти сроки наблюдения достигает

$14,29 \pm 0,44$ мкмоль/л (норма $8,59 \pm 0,43$ мкмоль/л) или 166% по отношению к физиологической норме. Необходимо отметить, что активность фермента и концентрация свободной фракции гидроксипролина выше по сравнению с показателями контрольной группы: активность коллагеназы составила 108%, а концентрация гидроксипролина – 112%. В эти же сроки наблюдения в первой группе животных содержание белково-связанного гидроксипролина – маркера синтеза коллагена – превышает норму более чем в 2,7 раза, а по отношению к показателям контрольной группы – в 8,5 раза. Данные, полученные при исследовании ГАГ, свидетельствуют о том, что их содержание ниже нормы и составляет $0,040 \pm 0,005$ г/л при нормальных значениях $0,057 \pm 0,003$ г/л или 70% от нормы, а по отношению к показателям контрольной группы – 46%.



Рис. 1. Биохимические показатели сыворотки крови крыс, которым вводили МСК непосредственно в сухожилие (7 сутки)

Таким образом, можно сделать вывод, что метаболизм соединительной ткани на 7 сутки после введения МСК активизируется, и синтетическая фаза превышает катаболическую. Об этом свидетельствуют показатели биохимических маркеров синтеза и распада органических составляющих соединительной ткани сухожилия.

Данные, полученные на 21 сутки после начала опыта, свидетельствуют о снижении активности коллагеназы в первой группе животных от $5,30 \pm 0,11$ мкмоль/л·ч на 7 сутки до $3,90 \pm 0,13$ мкмоль/л·ч. В процентном соотношении к норме это составило 139% (см. табл. 1, рис. 2). Наряду со снижением активности фермента снижается и концентрация свободной фракции гидрокси-

Таблица 1

Биохимические показатели сыворотки крови крыс, которым вводили МСК непосредственно в сухожилия

Показатели	Норма	Контрольная группа	7 сутки	21 сутки	45 сутки
Коллагеназа, мкмоль/л·ч	$2,80 \pm 0,15$	$4,90 \pm 0,10$	$5,30 \pm 0,11$	$3,90 \pm 0,13$	$3,00 \pm 0,10$
Свободная фракция ГП, мкмоль/л	$8,59 \pm 0,43$	$12,70 \pm 0,35$	$14,29 \pm 0,44$	$10,23 \pm 0,50$	$8,08 \pm 0,13$
Белково-связанная фракция ГП, мкмоль/л	$9,14 \pm 0,16$	$3,00 \pm 0,35$	$25,5 \pm 0,45$	$21,86 \pm 0,40$	$10,80 \pm 0,38$
ГАГ, г/л	$0,057 \pm 0,003$	$0,087 \pm 0,01$	$0,040 \pm 0,005$	$0,030 \pm 0,005$	$0,030 \pm 0,005$

пролина, а именно до $10,23 \pm 0,50$ мкмоль/л, что составляет 119% по отношению к норме. При этом сохраняется высокое содержание белковосвязанного гидроксипролина, превышая нормальные показатели в 2,4 раза. Это свидетельствует о том, что синтетическая фаза метаболизма белка коллагена превышает катаболическую. Концентрация ГАГ снижается до $0,030 \pm 0,005$ г/л (до 53% по отношению к норме).



Рис. 2. Биохимические показатели сыворотки крови крыс, которым вводили МСК непосредственно в сухожилие (21 сутки)

Таким образом, на 21 сутки после начала опыта показатели метаболизма соединительной ткани приближаются к физиологической норме.

На более поздних сроках, а именно на 45 сутки наблюдения, активность коллагеназы достигает почти нормальных величин – $3,00 \pm 0,10$ мкмоль/л·ч при норме $2,80 \pm 0,15$ мкмоль/л·ч или 107% по отношению к нормальным показателям. Содержание свободной фракции гидроксипролина несколько снижено и составляет 94% от нормы. Концентрация белковосвязанного гидроксипролина также приближается к норме и составляет 118% (см. табл. 1, рис. 3). Показатели, отражающие концентрацию ГАГ, остаются на уровне 21 суток наблюдения.

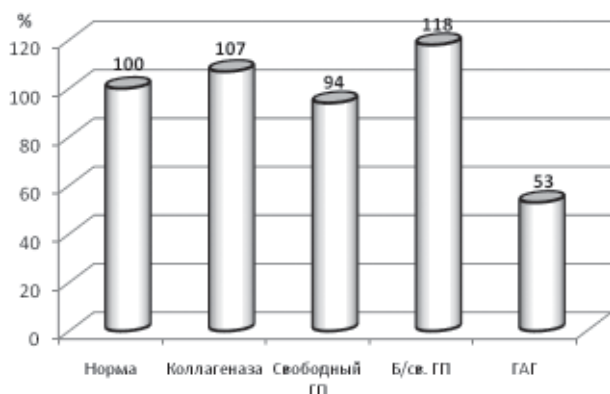


Рис. 3. Биохимические показатели сыворотки крови крыс, которым вводили МСК непосредственно в сухожилие (45 сутки)

Таким образом, биохимические данные, отражающие обмен веществ в соединительной ткани на 45 сутки после начала опыта, демонстри-

руют тенденцию: под воздействием МСК показатели как катаболической, так и синтетической фазы метаболизма приближаются к норме. Это свидетельствует о том, что МСК положительно влияет на восстановление метаболизма соединительной ткани, который нарушается при развитии дегенеративно-дистрофических процессов в сухожилиях у экспериментальных животных.

Данные, полученные при исследовании сыворотки крови у крыс, которым культуру МСК аутологического костного мозга вводили внутривенно (II группа), на 7 сутки после начала опыта свидетельствуют о высокой активности коллагеназы – наблюдается превышение физиологической нормы более чем в 2,3 раза, что в абсолютных показателях составляет $6,60 \pm 0,17$ мкмоль/л·ч при норме $2,80 \pm 0,15$ мкмоль/л·ч (табл. 2, рис. 4).

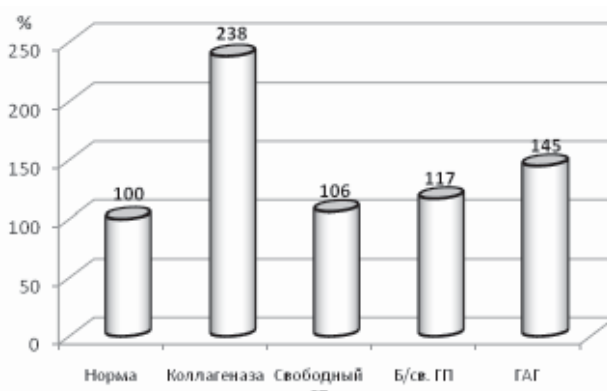


Рис. 4. Биохимические показатели сыворотки крови крыс, которым вводили МСК внутривенно (7 сутки)

Содержание свободной фракции гидроксипролина в эти же сроки наблюдения достигает физиологической нормы и составляет $9,10 \pm 0,22$ мкмоль/л. Концентрация белковосвязанного гидроксипролина чуть выше нормальных показателей и составляет $10,70 \pm 0,25$ мкмоль/л при норме $9,14 \pm 0,16$ мкмоль/л. Концентрация ГАГ превышает нормальные значения и составляет 145%, что свидетельствует об активности синтеза межклеточного вещества под действием введенной внутривенно культуры МСК.

На 21 сутки наблюдения активность фермента коллагеназы снижается до 186% по отношению к физиологической норме. Содержание свободной фракции гидроксипролина немного ниже нормы – 93%, что в абсолютных показателях составляет $8,00 \pm 0,35$ мкмоль/л. При этом необходимо отметить, что концентрация белковосвязанного гидроксипролина превышает нормальные значения на 24%, что свидетельствует о преобладании синтетической фазы метаболизма над катаболической (см. табл. 2, рис. 5). Содержание ГАГ достигает почти нормальных величин – $0,061 \pm 0,004$ г/л при норме $0,057 \pm 0,003$ г/л.

Биохимические показатели сыворотки крови крыс, которым вводили МСК внутривенно

Показатели	Норма	Контрольная группа	7 сутки	21 сутки
Коллагеназа, мкмоль/л·ч	2,80±0,15	4,90±0,10	6,60±0,17	5,20±0,15
Свободная фракция ГП, мкмоль/л	8,59±0,43	12,70±0,35	9,10±0,22	8,00±0,35
Белково-связанная фракция ГП, мкмоль/л	9,14±0,16	3,00±0,35	10,70±0,25	11,30±0,40
ГАГ, г/л	0,057±0,003	0,087±0,01	0,083±0,005	0,061±0,004



Рис. 5. Биохимические показатели сыворотки крови крыс, которым вводили МСК (21 сутки)

На основе полученных биохимических показателей можно сделать вывод, что внутривенное введение культуры МСК аутологического костного мозга способствует стабилизации метаболических процессов в пораженных введением Дипроспана сухожилиях экспериментальных животных.

При сравнении биохимических показателей сыворотки крови подопытных крыс с моделью дегенеративно-дистрофического поражения сухожилий, которым вводили МСК внутривенно (II группа) и непосредственно в толщу сухожилия (I группа), можно выделить следующие закономерности. Как на 7, так и на 21 сутки после введения культуры МСК активность коллагеназы по сравнению с контрольной группой выше во II группе животных, содержание свободной и белково-связанной фракций гидроксипролина – в I группе, а количество ГАГ – ниже в I группе, что свидетельствует о большей эффективности внесения МСК в толщу сухожилия, чем внутривенного метода введения. Хотя содержание свободной фракции гидроксипролина выше в I группе по сравнению со II группой, соотношение между содержанием его белково-связанной и свободной фракций значительно выше в I группе животных, что свидетельствует о большей степени преобладания процессов синтеза коллагена над процессами его распада в этой группе подопытных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные на экспериментальных животных биохимические данные показывают, что введение в толщу дегенеративно-дистрофически измененного сухожилия (I группа) или внутривенное введение (II группа) культуры МСК аутологического костного мозга способствует стабилизации метаболических процессов в органической основе соединительной ткани.

При сравнении показателей, отражающих метаболические процессы в органической основе соединительной ткани сухожилий на фоне влияния вышеуказанных культур МСК, оказалось, что более результативным методом является непосредственное введение культуры МСК в толщу дегенеративно-дистрофически измененного сухожилия. Это подтверждают как показатели активности коллагеназы, так и биохимические маркеры катаболизма и синтеза основного белка соединительной ткани – коллагена.

Таким образом, активность коллагеназы и содержание фракций гидроксипролина могут рассматриваться как индикатор процессов резорбции и синтеза элементов соединительной ткани пораженных сухожилий при данной патологии. Эти же данные могут служить биохимическими маркерами результативности клеточной терапии в клинике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коструб О. О., Бруско А. Т., Блонский Р. И., Заец В. Б. Модель дегенеративно-дистрофического поражения сухожилия (экспериментальное исследование) // Вісн. ортопед., травмат. та протезув. – 2009. – № 3. – С. 26–28.
2. Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. – 1999. – Vol. 284. – P. 143–147.
3. Wakitani S., Nawata M., Tensho K. et al. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees // J. Tissue. Eng. Regen. Med. – 2007. – Vol. 1. – P. 74–79.
4. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия. – М.: Медицина, 1990. – С. 518–526.
5. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 P.
6. Абрафикова Л. Г., Петренко Т. Ф., Высеканцев И. П., Грищенко В. И. Влияние нативных и криоконсервированных аллофибробластов на процессы регенерации кожных язв у крыс // Запорожский медицинский журнал. – 2010. – Т. 12, № 2. – С. 5–8.

7. Lindy S., Halme J. Collagenolytic activity in rheumatoid synovial tissue// Clin. Chim. Acta. – 1973. – Vol. 47, № 2. – P. 153–157.
8. Frey S. Etude d'une methode d'exploration et du taux normal de l'hydroxyproline du serum// Biochem., Biophys. – 1965. – Vol. 3, №2. – P. 446– 450.
9. Stegemann H. J. A simple procedure for the determination of hydroxyproline in urine and bone// Biochem. Med. – 1952. – Vol. 3, №1. – P. 23– 30.
10. Кляцкин С. А., Лифшиц Р. И. Методика определения гликозаминогликанов орциновым методом в крови больных// Лаб. Дело. – 1989. – №10, С. 51–53.

Магомедов С., Коструб О. О., Блонський Р. І., Кравченко О. М.

Вплив мезенхімальних стовбурових клітин на показники метаболізму сполучної тканини у експериментальних тварин

Проведено дослідження активності колагенази, визначено фракції гідроксипроліну та глікозаміногліканів в сироватці крові щурів з моделлю дегенеративно-дистрофічного ураження сухожиль, а також на тлі введення мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) аутологічного кісткового мозку.

Встановлено, що у експериментальних тварин при даній патології порушуються показники метаболізму сполучної тканини, а введення культури МСК сприяє нормалізації метаболічних процесів у сухожиллях.

Відзначено, що у порівнянні з внутрішньовенним, без-

посереднє введення культури клітин у товщу дегенеративно-дистрофічно зміненого ахіллового сухожилля є більш ефективним методом з точки зору поліпшення показників метаболізму сполучної тканини.

Ключові слова: колагеназа, гідроксипролін, глікозаміноглікани, мезенхімальні стовбурові клітини, ураження сухожиль.

Magomedov S., Kostrub O. O., Blonsky R. I., Kravchenko O. M.

The influence of mesenchymal stem cells placement on indicators of the connective tissue metabolism in experimental animals

A study of collagenase activity, hydroxyproline fractions and glycosaminoglycans content has been carried out in the serum of rats with induced degenerative tendon damages and while placing autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs).

It has been found that the experimental animals with such pathology undergo changes in metabolism of connective tissue and the injection of MSCs culture contributes to the normalization of metabolic processes in the tendons.

It is noted that compared with results for intravenous a direct placement of cell culture into the degenerative-dystrophic changed Achilles tendon is more efficient from the point of view of the improvement of connective tissue metabolic indices.

Keywords: collagenase, hydroxyproline, glycosaminoglycans, mesenchymal stem cells, injured tendons.