

- ceedings of the Second Open Scientific Meeting of The Hip Society. – St. Louis : C.V. Mosby, 1974. – P. 82–93.
41. The Acetabular Sector Angle of the Adult Hip Determined by Computed Tomography / *Anda S., Svenningsen S., Dale L. G., Benum P.* // *Acta Radiol.* – 1986. – Vol. 127. – P. 443.
42. *Wiberg G.* Studies on dysplastic acetabula and congenital subluxation of the hip joint : with special reference to the complication of osteoarthritis / *G. Wiberg* // *Acta Chir Scand.* – 1939. – Vol. 83 (Suppl.). – P. 58.

УДК 611.74:576.371+615.361

## ДЕТЕКЦІЯ ТРАНСПЛАНТОВАНИХ АУТОЛОГІЧНИХ КЛІТИН У ЛІКУВАННІ ДЕГЕНЕРАТИВНОГО ПОШКОДЖЕННЯ СУХОЖИЛЛЯ

О. О. Коструб<sup>1</sup>, В. І. Грищенко<sup>2</sup>, Р. І. Блонський<sup>1</sup>, Н. О. Волкова<sup>2</sup>, О. І. Гончарук<sup>2</sup>, О. П. Жулікова<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>ДУ “Інститут травматології та ортопедії АМН України”, м. Київ  
<sup>2</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

### **DETECTION OF TRANSPLANTATED AUTOLOGOUS CELLS IN TREATMENT OF DEGENERATIVE LESIONS OF TENDON**

*O. O. Kostrub, V. I. Hryshchenko, R. I. Blonskyi,  
N. O. Volkova, O. I. Honcharuk, O. P. Zhulikova*

*It is reported about detection of labeled autologous fibroblasts and multipotent mesenchymal stromal cells introduced into tendons of rats with degenerative and dystrophic lesion. It was shown that the introduced cells built into the structure of tendons and contributed to the their strength.*

*Key words: tendon, detection, luminescence, autologous cells, strength.*

### **ДЕТЕКЦИЯ ТРАНСПЛИАНТИРОВАННЫХ АУТОЛОГИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПРИ ЛЕЧЕНИИ ДЕГЕНЕРАТИВНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СУХОЖИЛИЯ**

*A. A. Kostrub, V. I. Grishchenko, R. I. Blonskiy, N. A. Volkova, E. I. Goncharuk, E. P. Zhulikova*

*Представлена детекция меченных аутологических фибробластов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК), введенных в сухожилия крыс с дегенеративно-дистрофическим повреждением. Показано, что введенные клетки встраиваются в структуру сухожилий и способствуют увеличению их прочности.*

*Ключевые слова: сухожилие, детекция, люминесценция, аутологические клетки, прочность.*

## Вступ

Тактика лікування хворих з дегенеративним пошкодженням сухожилля сьогодні не має чіткого патогенетичного обґрунтованого алгоритму лікування і характеризується неузгодженістю застосування різних методів лікування та їх низькою ефективністю. Ці труднощі пояснюються малим вмістом клітинних елементів (фібробластів та тендиноцитів) у тканині сухожилля взагалі та в дегенеративно зміненому зокрема. Власне клітини сухожилля відіграють важливу роль у процесах його регенерації та слугують основним джерелом синтезу колагену, позаклітинного матриксу та регуляторних пептидів – факторів росту.

Сьогодні одним із перспективних шляхів залучення до медичної практики досягнень молекулярної та клі-

тинної біології є застосування аутологічних фібробластів та мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) у лікуванні дегенеративного пошкодження сухожилля, з метою активізації та посилення репаративних процесів у дегенеративно зміненої тканині сухожилля. Проте, на нашу думку, дуже важливим моментом при вивченні впливу цих клітин на процеси регенерації в тканині сухожилля є детекція цих клітин у зоні патологічного процесу. Існують такі методи детекції трансплантованих клітин: радіоімунологічний; гістохімічний; люмінесцентний.

Для мічення клітин перед трансплантацією можуть бути:

- 1) люмінесцентні барвники органічного походження;
- 2) наночастки;

3) генетично вбудовані люмінесцентні зонди [10, 11, 14].

Для цього дослідження нами був обраний флюоресцентний барвник РКН-26 (Sigma), що зв'язується з мембраною клітин. Слід зазначити, що при застосуванні будь-яких люмінесцентних мітчиків важливим є питання гасіння фонової аутолюмінесценції тканини [9]. Феномен аутолюмінесценції пов'язаний з тим, що в структурі сухожилля переважає колаген I типу, що характеризується емісією з піком хвиль між 410 і 450 нм з плечем до 510 нм. Зменшення інтенсивності аутолюмінесценції може відбуватися шляхом додавання сторонніх домішок, збільшення концентрації самої люмінуючої речовини (концентраційне гасіння), а також під дією нагрівання, інфрачервоного опромінення, електромагнітного поля тощо [12]. Результати досліджень ряду авторів показали, що для гасіння аутолюмінесценції використовують деякі розчини, наприклад, гліцину, боргідриду Na, Sudan Black [9].

**Мета** роботи – визначити локалізацію люмінесцентно мічених аутологічних клітин у дегенеративно змінній тканині сухожилля при їх місцевому та генералізованому введенні.

## Матеріали і методи

Дослідження виконано на 56 статевозрілих щурасамцях, масою  $300 \pm 12$  г, розподілених на 4 групи по 14 тварин у кожній. Щурів утримували в умовах віварію на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до їжі та води. Дослідження проведені у вересні–листопаді 2010 р.

Використовували культивовані аутологічні МСК (АМСК), отримані з резеційованого фрагмента стегнової кістки [13]. Культуру аутологічних фібробластів (АФ) шкіри отримували за методом Л. Г. Абрафикова зі співавт. [1, 2].

Моделювання дегенеративно-дистрофічного пошкодження сухожилля у щурів ( $300 \pm 12$  г) проводили шляхом ін'єкційного введення в товщу ахіллового сухожилля 0,03 мл розчину дипроспану кожні 7 діб протягом 4 тижнів.

На 28 добу:

- тваринам *I дослідної групи* в кожне сухожилля вводили АМСК у дозі  $2,5 \times 10^5$  клітин;
- тваринам *II дослідної групи* вводили АМСК у дозі  $5 \times 10^5$  клітин внутрішньовенно;
- тваринам *III дослідної групи* вводили АФ у дозі  $2,5 \times 10^5$  клітин у кожне сухожилля;
- тваринам контрольної групи моделювали аналогічне пошкодження із введенням фізіологічного розчину.

Попередньо АМСК і АФ мітили флуоресцентним барвником РКН-26 (Sigma), що характеризується збудженням при  $\lambda=551$  нм та емісією при  $\lambda=557$  нм згідно з інструкцією фірми виробника.

Тварин виводили з експерименту на 7 і 21 добу з моменту проведення терапії. Усі маніпуляції з тваринами здійснювали відповідно до вимог біоетики та міжнародних принципів Європейської конвенції про захист

хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, а також “Загальними принципами експериментів на тваринах”, схваленими II Національним конгресом з біоетики (20.09.2004 р., Київ, Україна).

Для люмінесцентної мікроскопії (ЛОМО МИКМЕД-2) готували кріостатні зрізи сухожилля товщиною 7 мкм. Гасіння аутолюмінесценції проводили за допомогою інкубації зразків у 0,3 М розчині гліцину (Fluka) або 0,1% розчині боргідриду Na. Отримані результати фіксували фотографуванням. При статистичному опрацюванні результатів використовували однофакторний дисперсійний аналіз і t-критерій Стьюдента з програмою *Excel*.

## Результати та їх обговорення

### *Люмінесцентна мікроскопія кріостатних зрізів сухожилля* **Контрольна група**

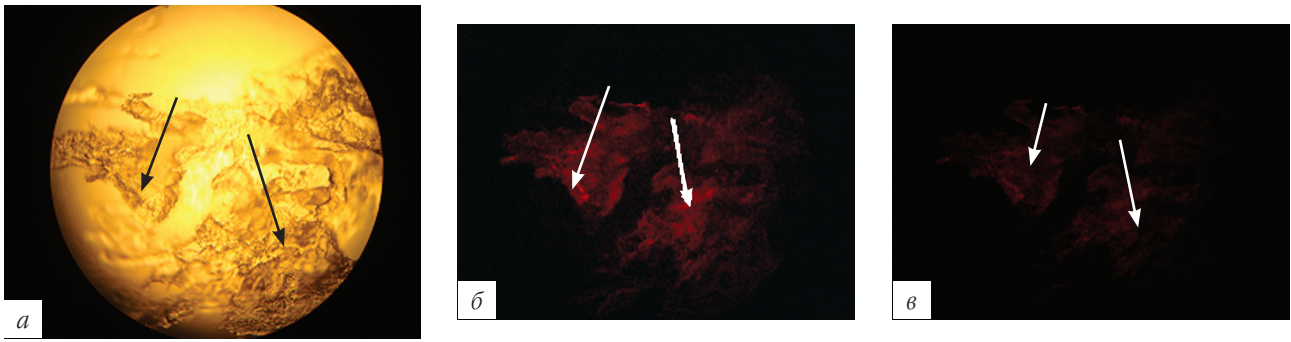
Люмінесцентна мікроскопія кріостатних зрізів сухожилля тварин *контрольної* групи показала, що досліджувана тканина має аутолюмінесценцію. Нами були проведені експерименти по гасінню (зниженню інтенсивності) аутолюмінесценції сухожилля, з метою більш точної візуалізації введених клітин. Для гасіння аутолюмінесценції нами було обрано 0,3 М розчину гліцину і 0,1% боргідриду Na, оскільки, на наш погляд, ці речовини найменш агресивні для тканини сухожилля (діапазон часу інкубації варіював у межах 10, 20, 30, 60 хв). Отримані результати показали, що 30-хвилинна інкубація зрізів призводить до зниження аутолюмінесценції до фонового рівня (рис. 1).

Як відомо, гліцин (аміноцтова кислота  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) оптично не активний, на відміну від інших амінокислот, і не обертає площину поляризованого світла вправо або вліво залежно від природи амінокислоти. Слід зазначити, що використання 0,1% боргідриду Na також призводить до аналогічного результату, однак часовий проміжок становить 60 хв. Таким чином, для гасіння аутолюмінесценції кріостатних зрізів сухожилля оптимальною є 30-хвилинна інкубація в розчині 0,3 М гліцину.

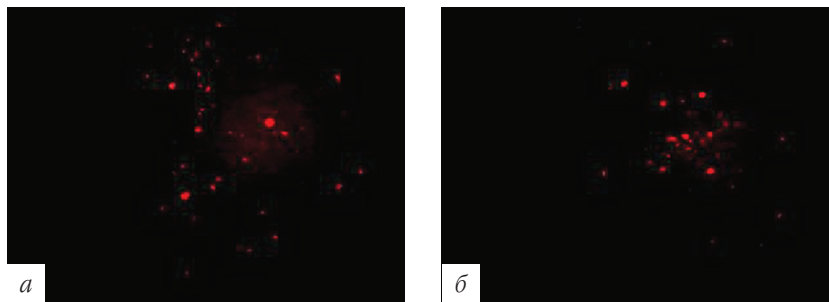
Важливим етапом було дослідження впливу гліцину на люмінесценцію самої мітки РКН-26, інтегрованої в клітини трансплантата. Нами було виконано серію експериментів з вивчення впливу розчину 0,3 М гліцину на люмінесцентні характеристики пофарбованих РКН-26 клітин АМСК, культивованих *in vitro*. Отримані дані представлені на рис. 2 і свідчать про те, що обробка гліцином не призводить до змін. Клітини люмінесціювали в червоному діапазоні спектра, світіння було яскравим і чітким.

Усі наступні дослідження кріостатних зрізів сухожилля тварин дослідних груп виконували із включенням етапу гасіння аутолюмінесценції.

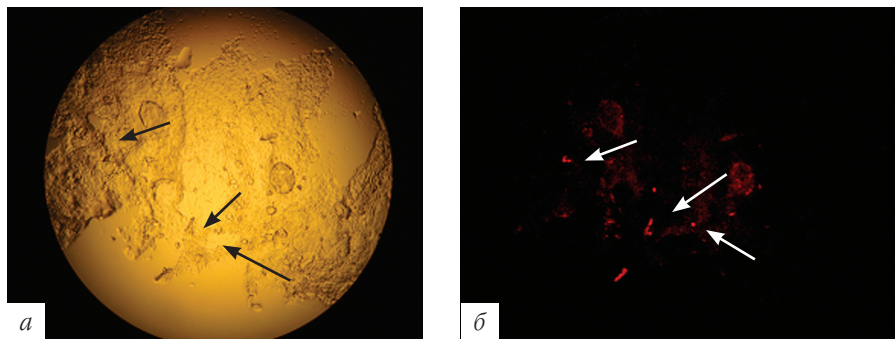
При люмінесцентній мікроскопії кріостатних зрізів сухожилля тварин *I–III груп* спостерігалось світіння в червоному діапазоні спектра на 7 і 21 добу після проведення терапії.



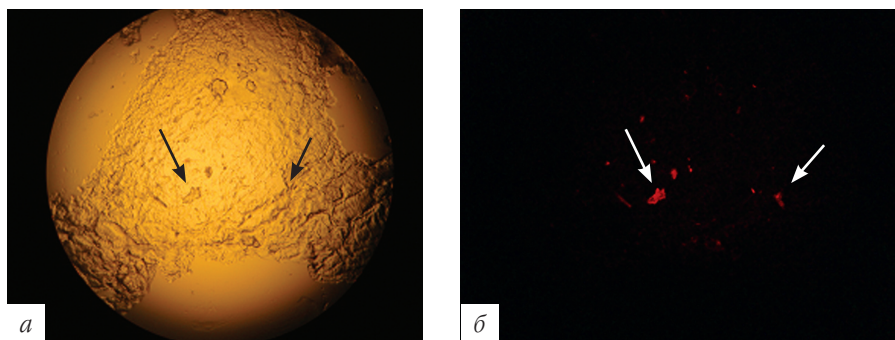
**Рис. 1.** Світлова (а) і люмінесцентна (без гасіння (б); з гасінням (в) аутолюмінесценції) мікроскопія сухожилля тварин контрольної групи. Одне й те саме поле зору, стрілками позначені об'єкти гасіння.  $\times 50$



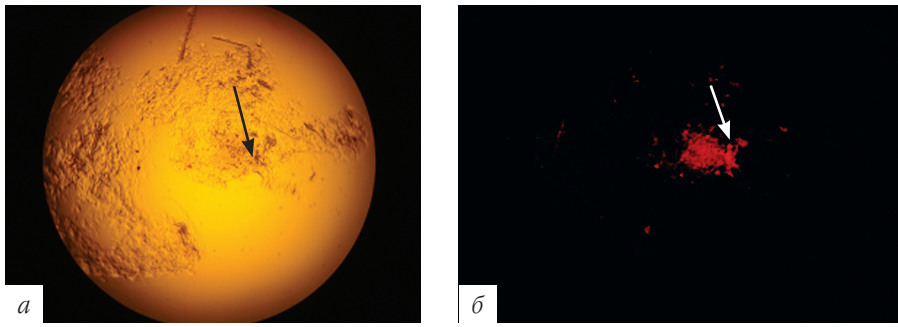
**Рис. 2.** Люмінесцентна мікроскопія культури АМСК: а – мічена РКН-26; б – після 30 хв інкубації в 0,3 М розчині гліцину. Представлено те саме поле зору.  $\times 50$



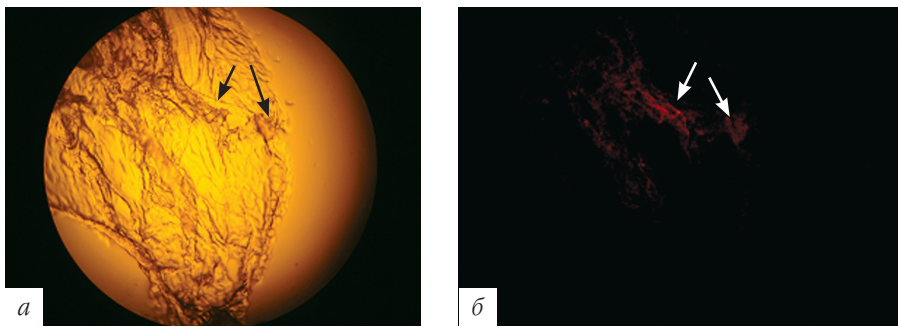
**Рис. 3.** Світлова (а) і люмінесцентна (б) мікроскопія сухожилля тварин I групи з терапією АМСК, мічених РКН-26 (локальне введення), 7 доба.  $\times 50$ . Стрілками позначені зони світіння



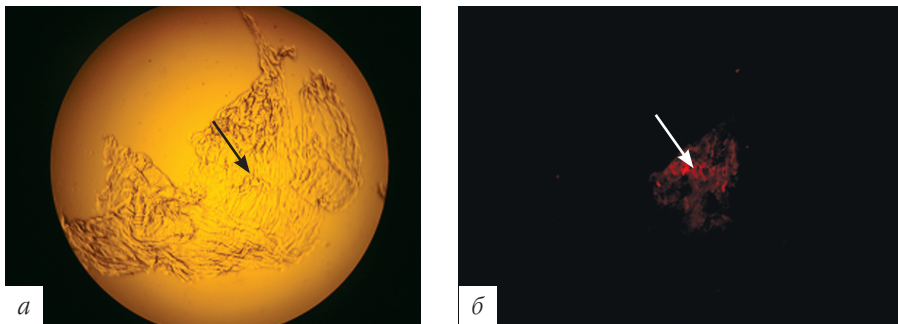
**Рис. 4.** Світлова (а) і люмінесцентна (б) мікроскопія сухожилля тварин I групи з терапією АМСК, мічених РКН-26 (локальне введення), 21 доба.  $\times 50$ . Стрілками зазначені зони світіння



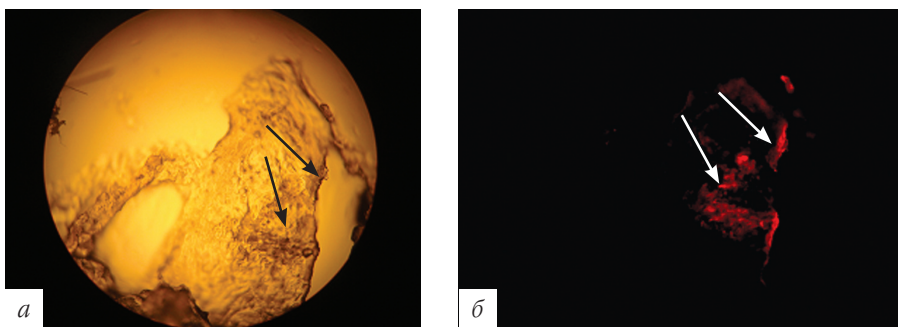
**Рис. 5.** Світлова (а) і люмінесцентна (б) мікроскопія сухожилля тварин II групи з терапією АМСК, мічених РКН-26 (внутрішньовенне введення), 7 доба.  $\times 50$ . Стрілками позначені зони світіння



**Рис. 6.** Світлова (а) і люмінесцентна (б) мікроскопія сухожилля тварин II групи з терапією АМСК, мічених РКН-26 (внутрішньовенне введення), 21 доба.  $\times 50$ . Стрілками позначені зони світіння



**Рис. 7.** Світлова (а) і люмінесцентна (б) мікроскопія сухожилля тварин III групи з терапією АФ, мічених РКН-26, 7 доба.  $\times 50$ . Стрілкою позначені зони світіння



**Рис. 8.** Світлова (а) і люмінесцентна (б) мікроскопія сухожилля тварин III групи з терапією АФ, мічених РКН-26, 21 доба.  $\times 50$ . Стрілками позначені зони світіння

**I група**

На 7 добу після проведення терапії світіння в червоному діапазоні спектра було чітким, мало вигляд вкраплень і локалізувалося по центру і краях препаратів (рис. 3).

На 21 добу – світіння в червоному діапазоні спектра характеризувалося невеликим зниженням інтенсивності порівняно з 7 добою, мало вигляд вкраплень і локалізувалося по центру препаратів (рис. 4). Зниження інтенсивності світіння може бути пояснене перерозподілом зв'язаного барвника в мембрані дочірніх клітин і може бути вказівкою на проліферацію трансплантованих клітин.

**II група**

На 7 добу після проведення терапії світіння в червоному діапазоні спектра було слабкої інтенсивності, не чітким і локалізувалося по центру і краях препаратів (рис. 5).

На 21 добу – світіння в червоному діапазоні спектра було не інтенсивним, локалізувалося по центру й краях препаратів (рис. 6). Наявність АМСК, що світяться в зоні ушкодження, свідчить про їх хоумінг.

**III група**

• На 7 добу після проведення терапії світіння в червоному діапазоні спектра було яскравим, чітким і локалізувалося по центру препаратів (рис. 7). Мічені клітини розташовувалися конгломератами між колагеновими волокнами.

• На 21 добу – світіння в червоному діапазоні спектра було інтенсивним, локалізувалося по центру й краях препаратів (рис. 8). Кількість елементів світіння збільшувалася порівняно з 7 добою, що може бути вказівкою на проліферацію мічених клітин.

Слід зазначити, що візуальне дослідження місць сухожилів із трансплантованими клітинами в усіх випадках показало відсутність запальної реакції.

На сьогоднішній день у світі існує багато способів відновлення пошкодженої структури сухожилів, до яких належать:

- 1) стимулювання регенераційних процесів шляхом введення фармацевтичних препаратів;
- 2) застосування клітинної терапії;
- 3) трансплантація аlogenної тканини сухожилля або синтетичних матеріалів [4, 6, 8].

Проте жоден з них не гарантує позитивного результату при лікуванні саме дегенеративних пошкоджень сухожилля.

Як відомо, аутологічні МСК кісткового мозку здатні диференціюватися в широкий спектр клітин, включаючи фібробласти й теноцити [13]. У повідомленні про дослідження авторів, які були проведені паралельно нашим експериментам, повідомляється про застосування МСК для лікування тендопатій у сполученні з колагеновими гелями і синтетичними матеріалами [15]. Слід відмітити кореляцію отриманих цими авторами результатів, щодо терапевтичного ефекту і збереженості

трансплантованих МСК в експериментах *in vitro* і наших даних в дослідях *in vivo*.

У нашій роботі показано, що при введенні АМСК як локально, так і способом внутрішньовенного введення клітини визначалися в сухожиллях, однак при локальному введенні у більшій кількості, ніж при внутрішньовенному. Це явище, ймовірно, пов'язано з тим, що трансплантовані внутрішньовенно АМСК потрапляють у велике коло кровообігу, переважно заселяючи органи кровоутворення, як показано в роботі Т. Х. Фатхудинова и др. [7].

Цікавим було виявлення відмінності між АМСК і АФ за характером світіння введених клітин. При використанні АФ на 21 добу спостереження визначали інтенсивне світіння введених клітин, які утворювали конгломерати, що розташовуються безпосередньо в оточенні колагенових волокон. При цьому використання АМСК при аналогічному способі введення у той же строк спостереження характеризувалося дифузним розподілом мічених клітин у сухожиллях. На нашу думку, одним з пояснень цього феномену можуть бути різні ростові характеристики введених клітин, а саме, більш високий проліферативний індекс культури фібробластів порівняно з мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами. Отримані дані про присутність мічених трансплантованих клітин у тканині дегенеративного сухожилля корелюють з даними гістологічного дослідження, що свідчать про виражений регенеративний ефект при використанні аутологічних клітин [8].

**Висновки**

1. При введенні мічених АМСК і АФ у зону пошкодження сухожилля на 7 і 21 добу в ній виявляється світіння, що вказує на присутність цих або їх дочірніх клітин у зоні введення.

2. При місцевому введенні АМСК відзначається присутність більшої кількості клітин у зоні пошкодження, ніж при внутрішньовенному введенні.

3. Хоумінг досліджуваних АМСК свідчить про можливість застосування внутрішньовенного шляху введення клітин при лікуванні дегенеративних пошкоджень сухожилля.

4. Застосування АМСК і АФ поліпшує міцнісні характеристики пошкоджених сухожилів.

**Література**

1. Белоусов А. Е. Микрохирургия в травматологии / А. Е. Белоусов, С. С. Ткаченко. – Л. : Медицина, 1998. – 223 с.
2. Влияние нативных и криоконсервированных аллофибробластов на процессы регенерации кожных язв у крыс / Абрафимова Л. Г., Петренко Т. Ф., Высекацнев И. П., Гриценко В. И. // Запорож. мед. журн. – 2010. – Т. 12, № 2. – С. 5–8.
3. Восстановительная хирургия поврежденных опорно-двигательного аппарата / Казарезов М. В., Королева А. М., Головин В. А. [и др.]. – М.–Новосибирск : НГМА, 2004. – С. 56–63.
4. Восстановление структуры сухожилий с применением биоматериалов Аллоплант / Мулдашев Э. Р., Нигматуллин Р. Т., Гафаров В. Г. [и др.]. – 2005. – № 1. – С. 56–61.

5. *Краснов А. Ф.* Клинические аспекты сухожильно-мышечной пластики / *А. Ф. Краснов, А. П. Чернов* // Ортопед., травматол. и протезир. – 1991. – № 3. – С. 46–52.
6. *Лаврищева Г. И.* Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей / *Г. И. Лаврищева, Г. А. Оноприенко*. – М.: Медицина, 1996. – С. 49–57.
7. Направление миграции мононуклеаров костного мозга при интракоронарном трансвентрикулярном введении / *Фатхудинов Т. Х., Слащева Г. А., Большакова Г. Б.* [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2009. – № 4. – С. 56–61.
8. Патоморфологічна картина змін у тканині дегенеративно-дистрофічно ураженого сухожилля після застосування аутологічних МСК, аутологічних фібробластів та аутологічної плазми, багатой на фактори росту (експериментальне дослідження) / *Бруско А. Т., Коструб О. О., Грищенко В. І.* [та ін.] // Вісн. ортопед., травматол. та протезув. – 2010. – № 1. – С. 5–9.
9. *Vaschong W.* Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM) / *Vaschong W., Suetterlin R., Laeng R. H.* // J. Histochem Cytochem. – 2001. – Vol. 49 (12). – P. 1565–1572.
10. Lanthanide phosphate nanorods as inorganic fluorescent labels in cell biology research / *Ratra Ch.* [et. al.] // Clinical Chemistry. – 2007. – Vol. 53. – P. 2029–2031.
11. Migration of engrafted neural stem cells is mediated by CXCL12 signaling through CXCR4 in a viral model of multiple sclerosis / *Carbajal K. S., Schaumburg C., Strieter R.* [et. al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – Vol. 15 (24). – P. 11068–11073.
12. *Montes G. S.* Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems / *G. S. Montes* // Cell. Biol. Int. – 1996. – Vol. 20 (1). – P. 15–27.
13. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / *Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C.* [et. al.] // Science. – 1999. – Vol. 284. – P. 143–147.
14. Newly synthesized carbocyanine fluorescent probes, their characteristics and behavior in proliferating cultures / *Goncharuk E. I., Borovoy I. A., Pavlovich E. V.* [et. al.] // Biopolymers and Cell. – 2009. – Vol. 25, № 6. – P. 484–490.
15. The effects of bone marrow stromal cell transplants on tendon healing in vitro / *Chunfeng Zhao, Hsiao-Feng Chieh, Karim Bakri* [et. al.] // Medical Engineering & Physics. – 2009. – № 31. – P. 1271–1275.

УДК 617.586:616-007.248:616.379-008.64-089

## **ХІРУРГІЧНЕ ЛІКУВАННЯ ДІАБЕТИЧНОЇ ОСТЕОАРТРОПАТІЇ СТОПИ В ГОСТРІЙ СТАДІЇ**

*А. П. Лябах, О. Е. Міхневич, В. М. Пятковський, О. А. Турчин, С. В. Хомич  
ДУ “Інститут травматології та ортопедії АМН України”, м. Київ*

### **SURGICAL TREATMENT**

#### **OF DIABETIC OSTEOARTHROPATHY OF THE FOOT AT THE ACUTE STAGE**

*A. P. Liabakh, O. E. Mikhnevych, V. M. Piatkovskiy, O. A. Turchyn, S. V. Homych*

*Results of surgical treatment of 16 patients with acute diabetic osteoarthropathy (DOA) of foot joints have been analyzed. All the patients did not have secondary infection of the arthropathy zone and anamnestically there were no trophic foot ulcers. The stage of DOA was defined according to the modified S. N. Eichenholz classification, the localization – according to L. J. Sanders and R. G. Frykberg. As for localization there were 4 patients with zone II, 2 patients with zone III, 5 patients with zones III and IV, and 5 patients with zone IV. The surgical procedure consisted in total synovectomy, removal of loose osteochondral fragments, arthrodesis with stable internal fixation. The results were assessed in terms from 12 to 30 months after operation according to the AOFAS score. The average function level was 91 scores for zone II localization, 87 scores for zone III, 75 scores for zones III and IV, 84 scores for zone IV.*

*Key words: diabetic foot, Charcot foot, osteoarthropathy.*

### **ХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ**

#### **ДИАБЕТИЧЕСКОЙ ОСТЕОАРТРОПАТИИ СТОПЫ В ОСТРОЙ СТАДИИ**

*А. П. Лябах, О. Э. Михневич, В. М. Пятковский, Е. А. Турчин, С. В. Хомич*

*Проанализированы результаты хирургического лечения 16 пациентов с диабетической остеоартропатией стопы (ДОА стопы) в острой стадии. У всех пациентов не было вторичного инфицирования участка артропатии и отсутствовал анамнез трофических язв стопы.*