

## ОЦІНКА ВПЛИВУ АУТОЛОГІЧНИХ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР НА ВІДНОВЛЕННЯ ДЕГЕНЕРАТИВНО ПОШКОДЖЕНОГО СУХОЖИЛЛЯ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

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

### ESTIMATION OF INFLUENCE AUTOLOGOUS CELLULAR CULTURES ON PROCEEDING IN THE DEGENERATIVE DAMAGED TENDON IN EXPERIMENT

O. O. Kostrub, [V. I. Gryshchenko], R. I. Blonskyi, O. I. Goncharuk, N. O. Volkova

*On the model of degenerative and dystrophic process of rats tendons comparative estimation of implantation of autologous plasma rich in growth factors, autologous mesenchymal stem cells and autologous fibroblasts on tendon structure reconstruction was made.*

*Key words: tendon, degenerative and dystrophic process, autologous plasma rich in growth factors, autologous mesenchymal stem cells, autologous fibroblast.*

### ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АУТОЛОГИЧЕСКИХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДЕГЕНЕРАТИВНО ПОВРЕЖДЕННОГО СУХОЖИЛИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А. А. Коструб, [В. И. Грищенко], Р. И. Блонский, Е. И. Гончарук, Н. А. Волкова

*На модели дегенеративно-дистрофического процесса сухожилия крыс проводили сравнительную оценку влияния имплантации аутологической плазмы, богатой факторами роста, аутологических мезенхимальных стромальных клеток и аутологических фибробластов на восстановление структуры сухожилия.*

*Ключевые слова: сухожилие, дегенеративно-дистрофический процесс, аутологическая плазма, богатая факторами роста, аутологические мезенхимальные стромальные клетки, аутологические фибробласты.*

### Вступ

Дегенеративно-дистрофічне пошкодження сухожилля — це патологічний процес, що виникає в тканині сухожилля під дією хронічного перевантаження або хронічного впливу на його тканину інших фізичних та хімічних чинників, що призводить до хронічного запального процесу в тканині сухожилля (тендиніт), з подальшою загибеллю спеціалізованих клітин (теноцитів), дезорганізацією волокнистих структур та з наступним заміщенням дефекту грубоволокнистою фіброзною тканиною, а також формуванням осередків осифікатів і некрозу в самій тканині сухожилля (тендиноз) та в місцях його прикріплення до кістки (ентезопатія), що призводить до виникнення стійкого больового синдрому, втрати сухожиллям його міцнісних характеристик, що може призвести до наступного його розриву [3].

Тактика лікування хворих з дегенеративно-дистрофічним пошкодженням сухожилля на сьогоднішній день не має чіткого патогенетичного обґрунтування, тому характеризується низькою ефективністю, що пояснюється нездатністю задіяних методів оптимізувати метаболічні та репаративні процеси в ураженому сухожиллі [7].

На нашу думку, одним із перспективних напрямків є залучення до арсеналу медичних засобів досягнень молекулярної та клітинної біології, а саме застосування

клітинної терапії в лікуванні дегенеративно-дистрофічних уражень сухожилля. До сучасних напрямків клітинної терапії при дегенеративно-дистрофічних змінах у тканині сухожилля відносять застосування аутологічних клітинних культур:

- 1) аутологічної плазми, багаті факторами росту (АПБФР);
- 2) аутологічних мезенхімальних стромальних клітин (АМСК) кісткового мозку;
- 3) аутологічних фібробластів (АФ) [5–7].

**Мета** дослідження — провести порівняльну оцінку впливу аутологічних клітинних культур на відновлення структури сухожилля при його дегенеративно-дистрофічному ураженні в експерименті.

### Матеріали і методи

У період вересня — листопада 2009 р. виконано експериментальне дослідження на 294 статевозрілих щура-самцях, масою 300±12 г, розподілених на 4 серії залежно від виду дослідження.

• У I–III серію експерименту ввійшло по 84 дослідні тварини, яким було виконано патоморфологічне і біохімічне дослідження сироватки крові, ІЧ-спектроскопія та визначення міцнісних характеристик.

• У *IV серію* ввійшло 42 тварини, яким була виконана люмінесцентна мікроскопія.

Щурів утримували в умовах клініки для експериментальних тварин на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до їжі та води. 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 [2].

Тварин усіх дослідних серій розподілили на 4 групи по 7 тварин у кожній, яким моделювали дегенеративно-дистрофічне ураження ахіллового сухожилля за розробленим нами методом [1]. Для порівняння взято 7 тварин з інтактним ахілловою сухожиллям і виділили їх у *V групу*.

Після отримання дегенеративно-дистрофічного ураження за 7 діб у товщу ахіллового сухожилля щурів *I–III серій*, на 0,25 см проксимальніше п'яtkового горба, разово вводили:

- у *I групі* (контрольний) — 0,025 мл фізіологічного розчину;
- у *II групі* — 0,025 мл аутологічної плазми, багатой факторами росту;
- у *III групі* — 0,025 мл культури АМСК кісткового мозку, взятого із крила клубової кістки (у дозі  $2,5 \times 10^5$  клітин);
- у *IV групі* — 0,025 мл культури аутологічних фібробластів, взятих з аутологічної дерми (у дозі  $2,5 \times 10^5$  клітин).

Тваринам *IV серії* плазму, багату факторами росту, не вводили.

Застосовували культури АМСК кісткового мозку та клітин фібробластів аутологічної шкіри, розробленими за методиками відділу кріобіології репродуктивних систем Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (Харків).

## Результати та їх обговорення

Для узагальнення отриманих результатів, а також порівняльної оцінки репаративних процесів у тканині дегенеративно зміненого ахіллового сухожилля дослідних тварин на різних стадіях лікування нами була запропонована та використана **оцінювальна шкала репаративних процесів тканини сухожилля**. За основу цієї шкали було взято основні принципи аналогічних OS та ICRS шкал, що використовуються сьогодні для оцінки репаративних процесів суглобового хряща, проте вони були адаптовані та доповнені нами, урахувавши особливості біології, біофізики та біомеханіки тканини сухожилля. Нами оцінена поверхнева структура сухожилля;

при світловій мікроскопії патоморфологічних препаратів — зміни паратендинію, характер розташування колагенових волокон та клітинних елементів на різних стадіях регенерації, відмічали наявність чи відсутність зон вторинної осифікації. За допомогою ІЧ-спектроскопії оцінювали молекулярний стан позаклітинного матриксу, колагену, зокрема його неупорядкованої та упорядкованої форми; також оцінювали міцнісні характеристики тканини сухожилля, визначаючи та порівнюючи показник руйнуючого навантаження при натязі сухожилля до та після терапії. Результати оцінювали на 7, 21 та 45 добу спостереження (таблиця).

Таблиця

**Шкала оцінки якості репаративних процесів тканини сухожилля**

Досліджувані матеріали	Вираженість змін	Бали
Макроскопічна структура тканини сухожилля	Рівномірна безперервна	2
	Неоднорідність структури без ознак перервності	1
	Неоднорідність структури з ознаками перервності	0
Наявність хвилястості колагенових волокон (мікроскопічне дослідження патоморфологічних препаратів)	Відсутня	3
	Незначно виражена	2
	Виражена	1
	Значно виражена	0
Розташування клітинних елементів у тканині сухожилля в зоні патологічного процесу при мікроскопічному дослідженні (на стадії запалення та репарації)	Колоніями	3
	Групами	2
	Поодинокі	1
	Відсутні	0
Розташування клітинних елементів у тканині сухожилля в зоні патологічного процесу при мікроскопічному дослідженні (на стадії ремоделювання)	Поодинокі рівномірно	3
	Нерівномірно групами	2
	Колоніями	1
	З ділянками відсутності клітинних елементів	0
Зміни в паратендинію (мікроскопічне дослідження патоморфологічних препаратів)	Відсутні	3
	Незначні	2
	Помірні	1
	Значні	0
Зони мінералізації тканини сухожилля (мікроскопічне дослідження патоморфологічних препаратів)	Відсутні	2
	Невідповідне розташування	0
Структура позаклітинного матриксу (визначення відношень СН-ОН за допомогою ІЧ-спектроскопії)	Норма (відхилення менше 5 %)	5
	Незначні зміни (відхилення 5–15 %)	4
	Помірні зміни (відхилення 15–30 %)	3
	Значні зміни (відхилення 30–50 %)	2
	Виражені зміни (відхилення 50–100 %)	1
	Суттєві зміни (відхилення понад 100 %)	0
Структура колагену (вміст потрійної спіралі)	Норма (відхилення менше 5 %)	5
	Незначні зміни (відхилення 5–15 %)	4
	Помірні зміни (відхилення 15–30 %)	3
	Значні зміни (відхилення 30–50 %)	2
	Виражені зміни (відхилення 50–100 %)	1
	Суттєві зміни (відхилення понад 100 %)	0
Структура колагену (вміст неупорядкованої форми)	Норма (відхилення менше 5 %)	5
	Незначні зміни (відхилення 5–15 %)	4
	Помірні зміни (відхилення 15–30 %)	3
	Значні зміни (відхилення 30–50 %)	2
	Виражені зміни (відхилення 50–100 %)	1
	Суттєві зміни (відхилення понад 100 %)	0
Зміна показника руйнуючого навантаження при натязі сухожилля порівняно до інтактного сухожилля	Норма (відхилення менше 5 %)	5
	Незначні зміни (відхилення 5–15 %)	4
	Помірні зміни (відхилення 15–30 %)	3
	Значні зміни (відхилення 30–50 %)	2
	Виражені зміни (відхилення 50–100 %)	1
	Суттєві зміни (відхилення понад 100 %)	0

Використовуючи цю шкалу оцінки, якість репаративних процесів вважали дуже поганою при отриманні сумарного балу "0" та оптимальною — при "33".

Так, **на 7 добу** спостереження найкращий показник за сумою балів відмічали у тварин *IV дослідної групи*, який становив 19 балів; дещо гірший результат спостерігався у тварин *II дослідної групи* — 17 балів; у тварин *III дослідної групи* — 15 балів. Слід зазначити, що у тварин *I групи* у ці ж терміни спостереження цей показник становив 10 балів (рис. 1).

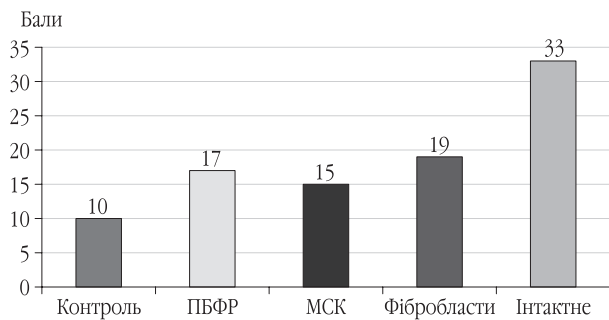


Рис. 1. Результати порівняльної оцінки на 7 добу спостереження

Проводячи порівняльну оцінку **на 21 добу** спостереження, найкращий показник за сумою балів відмічали також у тварин *IV дослідної групи*, що становив 24 бали, проте слід зазначити, що у тварин *III дослідної групи* в цей же термін спостереження загальна сума становила 23 бали, що була всього на 1 бал менше від показника тварин *IV дослідної групи*. Порівняно гірший результат спостерігався у тварин *II дослідної групи*, що становив 20 балів, і хоч ця сума балів була меншою на 4 бали від показника *IV дослідної групи*, проте вона була на 11 балів більшою від показника *I групи* тварин у цей же термін спостереження (рис. 2).

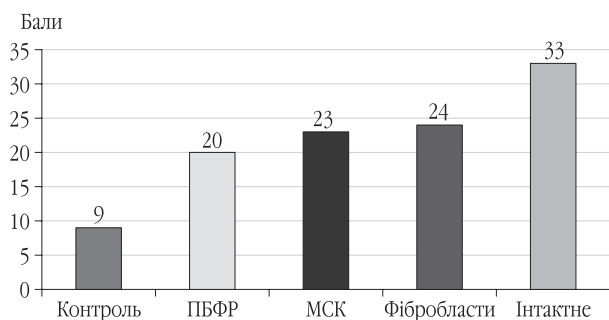


Рис. 2. Результати порівняльної оцінки на 21 добу спостереження

Результати порівняльної оцінки, отримані **на 45 добу**, супроводжувалися зміною лідера за сумою балів серед дослідних груп тварин. Так, у тварин *III дослідної групи* загальна сума балів становила 31, що було всього на 2 бали менше від показника інтактного сухожилля,

порівняно гірший результат спостерігався у тварин *IV дослідної групи* — 25 балів. У тварин же *II дослідної групи* загальна сума становила 22 бали, цей показник був менший від показника *IV дослідної групи* на 3 бали, проте був на 14 балів більше від показника *I групи* тварин (рис. 3).

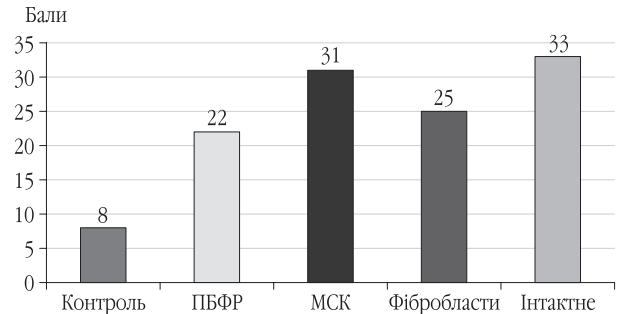


Рис. 3. Результати порівняльної оцінки на 45 добу спостереження

## Висновки

Виходячи з отриманих даних порівняльної оцінки використання АПБФР, АМСК та АФ з метою лікування дегенеративно-дистрофічного пошкодження сухожилля у дослідних тварин, найкращий результат спостерігали у тварин, яким у товщу ахіллового сухожилля вводили АМСК, дещо гірший результат — після застосування АФ та АПБФР. При цьому відмінність у показниках, які ми відмічали на різних строках спостереження, може свідчити про різний проліферативний потенціал, а також різну регенераторну здатність АПБФР, АМСК та АФ, а виходячи з цього і про їхню різну ефективність.

## Література

1. Модель дегенеративно-дистрофічного ураження сухожилля (експериментальне дослідження) / Коструб О.О., Бруско А.Т., Блонський Р.І., Заєць В.Б. // Вісн. ортопед., травматол. та протезув. — 2009. — № 3. — С. 26–28.
2. Скрипкин Ю.К. Фибробласти и их значение в тканевых реакциях: обзор литературы / Ю.К. Скрипкин, А.А. Кубанова // Арх. пат. — 1991. — № 12. — С. 65–68.
3. Спортивные травмы. Основные принципы профилактики и лечения / Под общей ред. П.А.Ф.Х. Ренстрема. — К.: Олимп. л-ра, 2002. — 378 с.
4. Albadlaq A. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics / A. Albadlaq, J.J. Mao // Stem. Cells. Dev. — 2004. — Vol. 13, №4. — P. 436–448.
5. Barry F.P. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells / F.P. Barry // Birth Defects Res C Embryo Today. — 2003. — Vol. 69, № 3. — P. 250–256.
6. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. — Strasburg, 1986. — 52 p.
7. Maffulli N. Tendon injuries. Basic science and clinical medicine / Maffulli N., Renström P., Leadbetter W.B. — London Limited: Springer Verlag, 2005. — 332 p.