

МІЦНІСТЬ СУХОЖИЛЛЯ НА РОЗТЯГУВАННЯ ПІСЛЯ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ ЙОГО ДЕГЕНЕРАТИВНОГО ПОШКОДЖЕННЯ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

О. О. Коструб¹, Р. І. Блонський¹, І. А. Лазарев¹, В. Б. Заець¹,
О. І. Гончарук², Н. О. Волкова², М. С. Юхта²

¹ ДУ "Інститут травматології та ортопедії АМН України", м. Київ

² Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, м. Харків М. С. Філіпова

TENDON TENSILE STRENGTH AFTER CELLULAR THERAPY APPLIED FOR TREATMENT OF ITS DEGENERATIVE LESION IN EXPERIMENT

O. O. Kostrub, R. I. Blonskyi, I. A. Lazarev, V. B. Zaets,
O. I. Goncharuk, N. O. Volkova, M. S. Yubta

On the model of degenerative-and-dystrophic process of tendons in rats comparative estimation of influence of implantation of autologous plasma rich in growth factors, autologous mesenchymal stem cells and autologous fibroblasts on strength properties of tendons was performed.

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

ПРОЧНОСТЬ СУХОЖИЛИЯ НА РАСТЯЖЕНИЕ ПОСЛЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ЕГО ДЕГЕНЕРАТИВНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

A. A. Kostrub, R. I. Blonskyi, I. A. Lazarev, V. B. Zaets,
E. I. Goncharuk, N. A. Volkova, M. S. Yubta

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 прочностных характеристик сухожилий.

Ключевые слова: сухожилие, дегенеративно-дистрофический процесс, аутологическая плазма, богатая факторами роста, аутологическая мезенхимальная стромальная клетка и 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 болювого синдрому, втрати сухожиллям його міцнісних характеристик, що може призвести до 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 пошкодженому 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 пошкоджень сухожилля. До сучасних напрямків клітинної терапії при дегенеративно-дистрофічних змінах у тканині сухожилля відносять застосування аутологічних клітинних культур:

- 1) аутологічної, збагаченої тромбоцитами, плазми (АЗТП);
- 2) аутологічних мезенхімальних стромальних клітин (АМСК) кісткового мозку;
- 3) аутологічних фібробластів (АФ) [5–7].

Слід зазначити, що одним із об'єктивних критеріїв оцінки ефективності клітинної терапії при дегенеративних пошкодженнях сухожилля є визначення зміни їх міцнісних характеристик, а саме — визначення показника руйнівного навантаження при натягу сухожилля.

Мета роботи — дослідити в експерименті міцність на розтягування інтактних, дегенеративно змінених сухожилля та сухожилля після введення аутологічної, збагаченої тромбоцитами плазми, культури аутологічних фібробластів, а також культури аутологічних мезенхімальних стромальних клітин.

Матеріали і методи

У період з вересня по листопад 2009 р. виконано експериментальне дослідження на 84 статевозрілих щурах-самцях, масою 250 ± 12 г.

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].

Усіх тварин розподілили на 5 груп по 7 тварин у кожній, тваринам *I–IV групи* моделювали дегенеративно-дистрофічне пошкодження ахіллового сухожилля за розробленим нами методом [1]. Після отримання дегенеративно-дистрофічного пошкодження ахіллового сухожилля через 7 діб у його товщу, на 0,25 см проксимальніше п'яtkового горба, разово вводили:

- у *I групи* (контрольній) — 0,025 мл фізіологічного розчину;
- у *II групи* — 0,025 мл аутологічної, збагаченої тромбоцитами, плазми;
- у *III групи* — 0,025 мл культури АМСК кісткового мозку, узятото із крила клубової кістки (у дозі $2,5 \times 10^5$ клітин);
- у *IV групи* — 0,025 мл культури аутологічних фібробластів, узятих з аутологічної дерми (у дозі $2,5 \times 10^5$ клітин).

У *V групи* ми взяли тварин з інтактним ахілловим сухожиллям — для порівняння.

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).

Досліджували міцнісні характеристики сухожилля у тварин *II групи* у лабораторії біомеханіки ДУ “ІТО АМНУ”, для цього нами було розроблено та сконструйовано пристрій для випробування біологічних препаратів на розтягування або стискування з можливістю розвивати зусилля до 0,1 Кн (рис. 1, 2).

Прилад для випробувань біологічних препаратів (рис. 2) складається з силової рами (2), виконаної з прямокутних труб $24 \times 24 \times 2$ см, на яких закріплені: динамометр (1), поворотний блок (3) та станина (15).

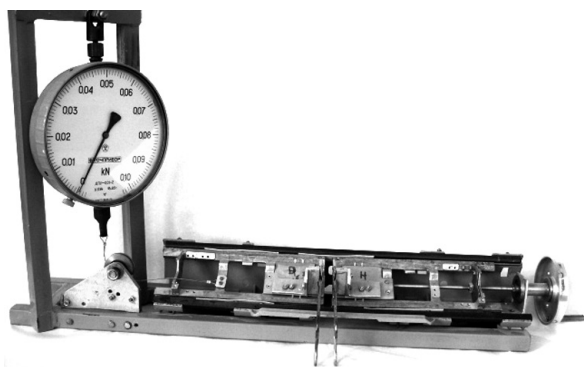


Рис. 1. Прилад для вимірювання міцнісних характеристик

Станина приладу виконана методом литва за моделями, до неї встановлені дві призматичні напрямні (7) з левованої сталі, загартовані на твердість, а також прошліфовані бігові доріжки (7) довжиною 507 мм. Паралельність напрямних може регулюватися з точністю до 0,01 мм.

За напрямними на 4-х кулькових сепараторах (6), трьома кульками діаметром 1,2 мм рухаються 2 столи: динамометричний стіл (5), який пов'язаний тросом 0,8 мм з динамометром, та навантажуючий стіл (10), пов'язаний за допомогою гайки, що самовстановлюється (11), з силовим гвинтом (12), опорним кульковим підшипником (13) і обертачем (14). На обох столах закріплені затискачі (9) для фіксації біологічних препаратів, як робочі органи використані голкотримачі, що забезпечують швидке і надійне прикріплення зразків. Застосування кулькових сепараторів забезпечує точне паралельне переміщення обох столів з мінімальними втратами на тертя. Застосування опорних кулькових підшипників — у поворотному блоці і механізмі приводу (14) силового гвинта, забезпечує плавне та легке обертання з мінімальними втратами тертя. Динамометр підвішений на арці силової рами за допомогою муфти, що дозволяє виконувати натягнення троса (4) динамометра. У процесі налаштування динамометричний стіл знаходиться в крайньому лівому положенні на упорі, обертання гайки муфти підводить стрілку динамометра (1) до “0”. У цьому ж положенні динамометричного столу (5) роблять закріплення препарату затискним пристроєм (8). Залежно від габаритів препарату, навантажуючий стіл за допомогою механізмів навантаження, рухаючи обертач, підводять до позиції закріплення препарату і затискають препарат. Потім, плавно рухаючи обертач, навантажують препарат, зчитуючи показання динамометра, та фіксують на папері силу, прикладену апаратом, при якій відбувається повний розрив досліджуваного препарату.

Руйнівне навантаження при розтягуванні визначали за формулою:

$$\sigma = N/S,$$

де N — прикладене навантаження до виникнення розриву сухожилля; S — площа перерізу сухожилля, що у свою чергу визначалася за формулою:

$$S = \pi \cdot a \cdot b = 4,71 \text{ мм}^2,$$

де $\pi = 3,14$; a — 0,5 висоти перерізу сухожилля = 1 мм; b — 0,5 ширини перерізу сухожилля = 1,5 мм.

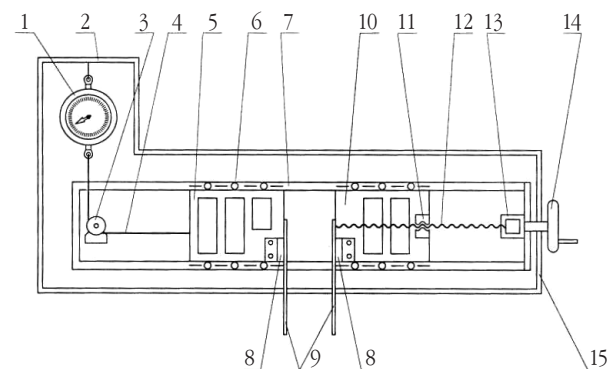


Рис. 2. Кінематична схема приладу (опис у тексті)

Результати та їх обговорення

Таблиця

Результати визначення руйнівного навантаження при розтягуванні сухожилля, МПа

Групи тварин	Строк спостереження, доба		
	7	21	45
I	4,25±0,0507	3,61±0,0495	3,19±0,0507
II	5,31±0,07	5,73±0,0717	6,37±0,07
III	4,88±0,0507	6,37±0,07	8,07±0,07
IV	5,73±0,0507	6,58±0,07	7,64±0,0507
V	8,49±0,07	8,49±0,0495	8,49±0,0495

У **I групі** тварин (табл.), яким у товщу ахіллового сухожилля вводили 0,025 мл фізіологічного розчину, спостерігали зменшення міцності сухожилля на розрив з кожним наступним строком спостереження — це проявлялося у зменшенні показника руйнівного навантаження при розтягуванні сухожилля.

На **7 добу** спостереження цей показник зменшився майже удвічі (на 49,9%) порівняно з показником руйнівного навантаження у **V групі** тварин, що становило відповідно 4,25±0,0507 МПа проти 8,49±0,07 МПа.

На **21 та 45 добу** спостереження ми продовжували відмічати зменшення цього показника у **I групі** тварин порівняно з показником тварин **V групи**, різниця між яким становила 58 та 62% (3,61±0,0495 та 3,19±0,0507 проти 8,49±0,07 МПа, відповідно). Вищезазначені зміни в показнику руйнівного навантаження при розтягуванні сухожилля можуть свідчити про прогресування дегенеративно-дистрофічного процесу в тканині сухожилля.

У **II групі** тварин на **7 добу** після введення в товщу ахіллового сухожилля 0,025 мл АЗТП відмічали зростання показника руйнівного навантаження при розтягуванні сухожилля на 25% порівняно з таким показником **I групи** тварин, проте він був нижчий на 38% від цього ж показника у **V групі** (див. табл.).

На **21 добу** відмічали подальше зростання цього показника: порівняно з 7 добою — на 8%; та порівняно з **I групою** у ці ж строки спостереження — на 60%.

На **45 добу** спостереження подібна динаміка зміни показника руйнівного навантаження зберігалась і відобразилась його зростанням на 11% порівняно з попереднім строком спостереження та на 99,6% порівняно з **I групою**.

При цьому різниця між показником руйнівного навантаження при розтягуванні сухожилля та показником тварин **V групи** становила 24,9%.

У **III групі** тварин загальна тенденція змін показника руйнівного навантаження при розтягуванні сухожилля була схожою з цими показниками у **II групі**, проте мала більш виражений характер (див. табл.).

Так, за **7 днів** після введення в товщу ахіллового сухожилля 0,025 мл АМСК у дозі 2,5×10⁵ клітин в 1 мл відмічали зростання показника руйнівного навантаження при розтягуванні сухожилля на 15% порівняно з цим показником **I групи** тварин, проте він був нижчий на 42,5% від цього ж показника у тварин **V групи**.

На **21 добу** відмічали подальше зростання цього показника на 30,5% порівняно з 7 добою спостереження та на 76,5% порівняно з **I групою** тварин у ці ж строки.

На **45 добу** спостереження подібна динаміка зміни показника руйнівного навантаження зберігалась і відобразилась його зростанням на 27% порівняно з попереднім строком спостереження та на 153% порівняно з **I групою**. При цьому різниця між показниками руйнівного навантаження при розтягуванні сухожилля та з показником тварин **V групи** становила всього 4,95%.

У **IV групі** тварин загальній тенденції змін показника руйнівного навантаження були схожими з показниками тварин **III групи**, проте мали ряд відмінностей (див. табл.).

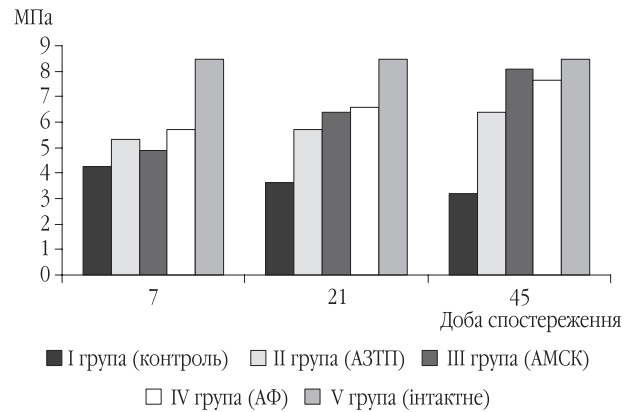


Рис. 3. Зміна показника руйнівного навантаження при розтягуванні сухожилля в різних дослідних групах залежно від строку спостереження

Так, за **7 днів** після введення в товщу ахіллового сухожилля 0,025 мл АФ у дозі 2,5×10⁵ клітин в 1 мл відмічали зростання показника руйнівного навантаження при розтягуванні сухожилля на 35% порівняно з таким показником у **I групі** тварин та на 32,5% від цього ж показника у **V групі**.

На **21 добу** відмічали подальше зростання цього показника: на 15% порівняно з 7 добою спостереження та на 82% порівняно з **I групою** тварин у ці ж строки спостереження.

На **45 добу** подібна динаміка зміни показника руйнівного навантаження зберігалась, що відобразилось у його зростанні на 16% порівняно з попереднім строком спостереження та на 139,5% порівняно з **I групою** тварин. Проте цей показник був нижчим на 10% порівняно з **V групою**.

Зміна показника руйнівного навантаження при розтягуванні сухожилля в різних дослідних групах залежно від строку спостереження наведена на рис. 3.

Висновки

Оцінюючи отримані результати, а також порівнюючи їх у різні строки спостереження, можна зробити певні висновки.

Так, на **7 добу** спостереження найкращий показник руйнівного навантаження при розтягуванні сухожилля порівняно з **I групою** тварин спостерігався у тварин

IV групи, що становив $5,73 \pm 0,0507$ МПа, він перевищував цей показник у *II* та *III групі* тварин на 7 та 15% відповідно, проте був нижчим від показника тварин *V групи* на 32,5%.

На 21 добу спостереження ця тенденція зберігалася і становила відповідно 13% та 3% порівняно з *II* та *III групами* тварин, різниця ж з показником тварин *V групи* становила 22,5%. Слід відмітити зменшення різниці між показниками *III* та *IV групи* та збільшення різниці між показниками *II* та *IV групи* в ці строки спостереження.

На 45 добу спостереження у тварин *III групи* відмічали найкращий показник руйнівного навантаження при розтягуванні сухожилля порівняно з контрольною групою тварин, що становив $8,07 \pm 0,07$ МПа і перевищував цей показник у *II* та *IV групи* тварин на 21% та 5,3% відповідно, та був нижчим від показника у тварин *V групи* всього на 4,95%. Слід відмітити зміну лідерства в показниках руйнівного навантаження при розтягуванні сухожилля між тваринами *III* та *IV групи* та збільшення різниці між цими показниками у тварин *II групи* порівняно з *III* та *IV групами* тварин у ці ж строки спостереження.

Усе вищезазначене може свідчити про різний проліферативний потенціал, а також різну регенераторну здатність у АЗТП, АМСК та АФ, що має велике значення при їх застосуванні у лікуванні дегенеративно-дистрофічного пошкодження сухожилля у клінічній практиці.

Література

1. Модель дегенеративно-дистрофічного ураження сухожилля (експериментальне дослідження) / О. О. Коструб, А. Т. Бруско, Р. І. Блонський, В. Б. Заєць // Вісн. ортопед., травматол. та протезув. — 2009. — № 3. — С. 26–28.
2. Скрипкин Ю. К. Фибробласты 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 / N. Maffulli, P. Renström, W. B. Leadbetter — London Limited: Springer Verlag, 2005. — 332 p.

УДК 616.728.2-007.24(083.3)001.57

МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ НАСЛІДКІВ ЧАСТКОВОГО РОЗЛАДУ СФЕРИЧНОСТІ ГОЛОВКИ СТЕГНОВОЇ КІСТКИ Частина II*

В. В. Філіпчук¹, А. Д. Супрун², Л. В. Шмельова²

¹ДУ “Інститут травматології та ортопедії АМН України”, м. Київ

²Київський національний університет ім. Т. Шевченка, Україна

MATHEMATICAL MODELING OF CONSEQUENCES OF PARTIAL DISTURBANCE IN FEMORAL HEAD SPHERICITY. Part II

V. V. Filipchuk, A. D. Suprun, L. V. Shmeleva

The purpose of the article was to clear up the biomechanical pathogenesis of the aspherical cause of hip impingement. Distribution of the force density vector per area unit from the external load to the contact area of the articular surfaces was analyzed on the basis of the developed mathematical model of the femoral head which was in the elastic contact to the acetabulum and had a deformity in a form of the cone-shaped outgrowth.

It was shown that the maximum stress load was on the circular edge of the contact spot between the head and the acetabulum, what explains not only the clinical manifestations of the hip impingement but some biomechanical “paradoxes” of the previous classical approaches of study of delamination of the articular cartilage of the hip joint.

Key words: mathematical modeling, hip joint, hip impingement.

* Частина I надрукована в журналі № 2 за 2011 р., с. 28–34.