

- implantation duration in a rabbit model / *Thomann M., Krause C., Bormann D. [et al.] // Mat.-wiss. und Werkstofftech.* — 2009. — Vol. 40. — P. 82–87.
6. Immunohistochemical, tomographic and histological study on on-lay bone graft remodelling. Part II : calvarial bone / *Pedrosa Jr. W. F.,*

Okamoto R., Faria P. E. P. [et al.] // Clin. Oral. Impl. Res. — Vol. 20, 2009. — P. 1254–1264.

7. Osteopontin — a possible anchor of osteoclasts to bone / *Reinbolt F. P., Hultenby K., Oldberg A., Heinegård D. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1990. — Vol. 87, № 12. — P. 4473–4475.

УДК 616-008.9:611.018.2591.474-00.17.001.6

ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПОВРЕЖДЕННЫХ СУХОЖИЛИЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

С. Магомедов, А. А. Коструб, Е. Н. Кравченко, Р. И. Блонский
ГУ “Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины”, г. Киев

THE INFLUENCE OF GROWTH FACTORS INJECTION ON METABOLIC PROCESSES IN THE CONNECTIVE TISSUE OF DAMAGED TENDONS OF EXPERIMENTAL ANIMALS

S. Magomedov, A. A. Kostrub, E. N. Kravchenko, R. I. Blonskyi

On the background of the injection of autologous plasma enriched with growth factors, in the serum of experimental animals with a model of degenerative-and-dystrophic tendon damages the collagenase activity, hydroxyproline fractions and the content of glycosaminoglycans were investigated.

The results showed that the injection of growth factors contributes to the normalization of metabolic processes in tendons.

Key words: collagenase, hydroxyproline, glycosaminoglycans, tendon damages, growth factors.

ВПЛИВ ВВЕДЕННЯ РОСТОВИХ ФАКТОРІВ НА МЕТАБОЛІЧНІ ПРОЦЕСИ У СПОЛУЧНІЙ ТКАНИНІ УРАЖЕНИХ СУХОЖИЛЬ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

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

На фоні введення аутологічної плазми, збагаченої ростовими факторами, у сироватці крові експериментальних тварин з моделлю дегенеративно-дистрофічного ураження сухожиль проведено дослідження активності колагенази, визначено фракції гідроксипроліну та глікозаміногліканів.

Результати дослідження показали, що введення ростових факторів сприяє нормалізації метаболічних процесів у сухожиллях.

Ключові слова: колагеназа, гідроксипролін, глікозаміноглікани, ураження сухожиль, ростові фактори.

Введение

Клеточная терапия в последние годы приобретает широкую популярность, в частности, при лечении пациентов ортопедического профиля. Например, стволовые клетки используют при восстановлении переломов и дефектов костей и суставов [4], для лечения несовершенного остеогенеза [10], остеоартрита и других поражений суставов [11] и т.д. Что касается лечения больных с дегенеративным поражением сухожилий, то, к сожалению, консервативные методы не могут обеспечить

полного и стойкого излечения осложнений, сопровождающих поражение сухожилий, ведь биологические и биомеханические функции соединительной ткани полностью не восстанавливаются. Новые стратегии лечения больных сконцентрированы на трансплантировании или мобилизации *in situ* мезенхимальных предшественников или стволовых клеток, которые активизируют репаративные процессы [3, 5, 12, 14], использовании ростовых факторов [4]. В частности было показано, что клеточная терапия имела противовоспалительный эффект, наблюдались значительные

улучшения структуры и однородности коллагеновых волокон, улучшение заживления сухожилий.

Таким образом, разработка высокотехнологических методов восстановления структуры сухожилий с использованием новейших исследований клеточной терапии позволит оптимизировать течение репаративных процессов, снизить риск осложнений при хирургическом вмешательстве и ускорить заживление, а на молекулярном уровне — улучшить структуру коллагеновых волокон.

Для понимания метаболических процессов, происходящих в ткани пораженных сухожилий и на фоне применения клеточной терапии, важно исследовать показатели основных маркерных элементов соединительной ткани. А именно: активность коллагеназы как фермента, который проявляет протеолитическую активность по отношению к коллагеновым волокнам, соотношение свободной и белково-связанной фракций аминокислоты гидроксипролина, что соответственно указывает на преобладание процессов синтеза или распада коллагена, а также содержание гликозаминогликанов, которые образуют основную субстанцию межклеточного матрикса соединительной ткани, определяющего как биомеханические, так и физиологические свойства этой ткани [1].

Цель исследования — изучить в динамике в сыворотке крови опытных животных показатели метаболизма соединительной ткани сухожилий при их дегенеративных повреждениях и на фоне введения аутологической плазмы, обогащенной факторами роста.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 21 половозрелых крысах-самцах, массой 300 ± 12 г. 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 [6].

У всех животных моделировали дегенеративно-дистрофическое поражение ахиллова сухожилия по разработанному методу [3]. 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 аутологической плазмы, обогащенной ростовыми факторами.

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

В сыворотке крови этих животных определяли следующие показатели: активность коллагеназы, фракции гидроксипролина (ГП) и гликозаминогликанов (ГАГ).

- Активность коллагеназы определяли по Lindy [9];
- фракции гидроксипролина выделяли по методу Frey [8];
- гидроксипролин во фракциях определяли по Stegemann [13];
- общее содержание гликозаминогликанов — по методу С.А. Кляцкина и Р.И. Лифшиц [2].

Результаты и их обсуждение

На 7 сутки

Биохимические показатели, полученные при исследовании сыворотки крови у животных, которым вводили в дегенеративно-дистрофически измененное сухожилие 0,1 мл аутологической плазмы крови, обогащенной факторами роста, на фоне патологических изменений, вызванных введением в толщу сухожилия дипроспана, на 7 сутки после введения выявили: возрастание активности коллагеназы более чем в 2,4 раза ($6,90 \pm 0,15$ при норме $2,80 \pm 0,15$ мкмоль/л·ч), что в процентном соотношении составило 246%. В эти же сроки исследования концентрация свободной фракции ГП составила $15,79 \pm 0,45$ мкмоль/л, достигая 184% нормы (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1

Биохимические показатели сыворотки крови крыс, которым вводили аутогенную плазму, обогащенную факторами роста

Показатели	Норма	Контрольная группа	7 сутки	21 сутки	45 сутки
Коллагеназа, мкмоль/л·ч	$2,80 \pm 0,15$	$4,90 \pm 0,10$	$6,90 \pm 0,15$	$4,60 \pm 0,14$	$3,40 \pm 0,14$
Свободная фракция ГП, мкмоль/л	$8,59 \pm 0,43$	$12,70 \pm 0,35$	$15,79 \pm 0,45$	$8,60 \pm 0,44$	$7,90 \pm 0,35$
Б/связанная фракция ГП, мкмоль/л	$9,14 \pm 0,16$	$3,00 \pm 0,35$	$14,90 \pm 0,50$	$10,40 \pm 0,50$	$9,60 \pm 0,50$
ГАГ, г/л	$0,057 \pm 0,003$	$0,087 \pm 0,01$	$0,033 \pm 0,004$	$0,020 \pm 0,004$	$0,050 \pm 0,006$

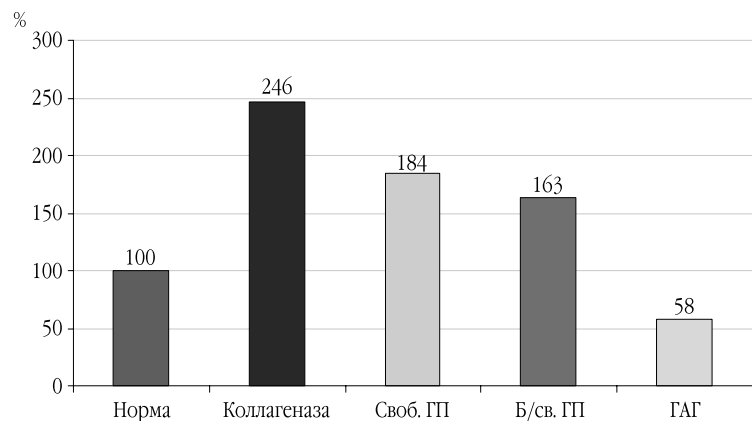


Рис. 1. Биохимические показатели сыворотки крови животных, которым вводили аутогенную плазму, обогащенную факторами роста (7 сутки)

Содержание белковосвязанного ГП превышает норму более, чем в 1,6 раза, что составляет 163% по отношению к норме. В абсолютных показателях это составило $14,90 \pm 0,50$ мкмоль/л (норма — $9,14 \pm 0,16$ мкмоль/л). Концентрация ГАГ в эти сроки наблюдения составила 58% нормы, а в абсолютных показателях — $0,033 \pm 0,004$ г/л при норме $0,057 \pm 0,003$ г/л.

На 21 сутки

На 21 сутки после введения препарата в толщу сухожилия у этой группы животных активность коллагеназы снижается до 164% по отношению к норме, тогда как этот показатель на 7 сутки превышал 246%, т.е. наблюдали снижение активности фермента более чем на 80%. Одновременно со снижением активности коллагеназы снижается и концентрация свободной фракции ГП — маркера резорбции коллагена. Содержание этой аминокислоты достигло нормальных величин и составило $8,60 \pm 0,44$ при норме $8,59 \pm 0,43$ мкмоль/л. Концентрация белковосвязанного ГП — маркера синтеза белка коллагена — составила 114% по отношению к норме, тогда как на 7 сутки она достигла 163% (см. табл. 1, рис. 2). Содержание ГАГ снизилось и составило 35% от нормы, а на 7 сутки было 58%.

На 45 сутки

Биохимические показатели, полученные на 45 сутки исследования после введения аутологической плазмы крови, обогащенной факторами роста, свидетельствуют о том, что активность коллагеназы продолжает снижаться по сравнению с показателями предыдущих сроков наблюдений и приближается к норме, что составило 121%, а в абсолютных показателях — $3,40 \pm 0,14$ при норме $2,80 \pm 0,15$ мкмоль/л·ч. Содержание свободной фракции ГП снижается до 92%, а в абсолютных показателях — до $7,90 \pm 0,35$ при норме $8,59 \pm 0,43$ мкмоль/л. Аналогичные изменения мы наблюдали и в содержании белковосвязанного ГП. Концентрация этой аминокислоты составила 105% по отношению к норме, а в абсолютных показателях — $9,60 \pm 0,5016$ мкмоль/л при физиологической норме $9,14 \pm 0,16$ мкмоль/л (см. табл. 1, рис. 3).

В эти сроки исследования у этой группы животных концентрация ГАГ достигает 88%, тогда как их содержание на 21 сутки исследования было 35%, т.е. приближается к норме.

Следует отметить, что введение аутологической плазмы крови, обогащенной факторами роста, в толщу сухожилия с дегене-

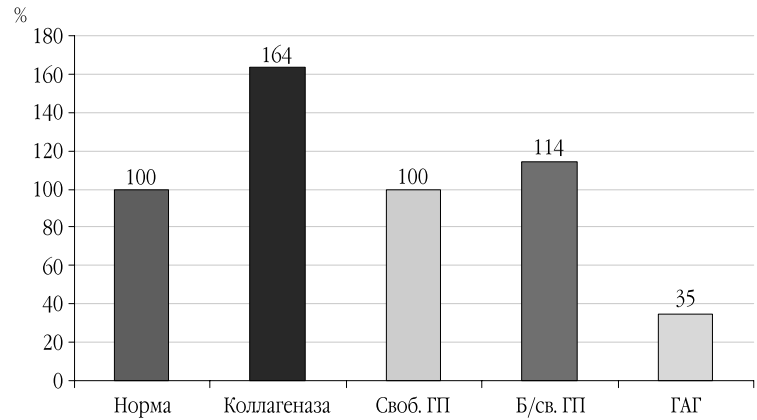


Рис. 2. Биохимические показатели сыворотки крови животных, которым вводили аутогенную плазму, обогащенную факторами роста (21 сутки)

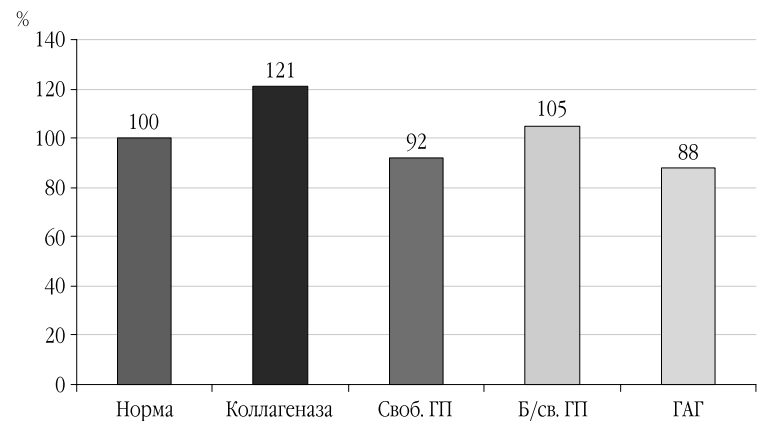


Рис. 3. Биохимические показатели сыворотки крови животных, которым вводили аутогенную плазму, обогащенную факторами роста (45 сутки)

ративно-дистрофическими изменениями, вызванными действием дипроспана, способствует стабилизации метаболических процессов в очаге поражения. Об этом свидетельствуют показатели активности фермента коллагеназы и содержание свободной фракции ГП, а также показатели, отражающие концентрацию ГАГ.

Выводы

Таким образом, полученные на экспериментальных животных результаты исследования указывают на то, что введение в толщу дегенеративно-дистрофически измененного сухожилия аутологической плазмы, обогащенной ростовыми факторами, способствует стабилизации метаболических процессов в органической основе соединительной ткани, что позволяет рекомендовать практическое применение данной методики пациентам с дегенеративно-дистрофическими поражениями сухожилий.

Экспериментальными исследованиями была подтверждена значимость некоторых индикаторов состояния соединительной ткани (активность коллагеназы, содержание фракций ГП и ГАГ) — как показателей процессов резорбции и синтеза тканей пораженных сухожилий.

Литература

1. Березов Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. — М.: Медицина, 1990. — С. 518–526.
2. Кляцкин С.А. Методика определения гликозаминогликанов орциновым методом в крови больных / С.А. Кляцкин, Р.И. Лифшиц // Лаб. дело. — 1989. — № 10. — С. 51–53.
3. 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.
4. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects : a novel use for adipose tissue / Nathan S., Das S., Thamyab A. [et al.] // Tissue Engineering. — 2003. — Vol. 9. — P. 733–744.
5. Diekman B.O. Stem cell-based therapies for osteoarthritis : challenges and opportunities / B.O. Diekman, F. Guilak // Curr. Opin. Rheumatol. — 2013. — Vol. 25, № 1. — P. 119–126.
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. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors / Anitua E., Sánchez M., Zalduendo M.M. [et al.] // Cell Prolif. — 2009. — Vol. 42, № 2. — P. 162–70.
8. Frey S. Etude d'une methode d'exploration et du taux normal de l'hydroxyproline du serum / S. Frey // Biochem., Biophys. — 1965. — Vol. 3, № 2. — P. 446–450.
9. Lindy S. Collagenolytic activity in rheumatoid synovial tissue / S. Lindy, J. Halme // Clin. Chim. Acta. — 1973. — Vol. 47, № 2. — P. 153–157.
10. Mesenchymal stem cell engraftment in bone following in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta / Le Blanc K., Götherström C., Ringdén O. [et al.] // Transplantation. — 2005. — Vol. 79, № 11. — P. 1607–1614.
11. Repair of full-thickness tendon injury using connective tissue progenitors efficiently derived from human embryonic stem cells and fetal tissues / Coben S., Lesbansky L., Zussman E. [et al.] // Tissue Engineering, Part A. — 2010. — Vol. 16. — P. 3119–3137.
12. Russell J.E. Collagen synthesis during primate flexor tendon repair in vitro / J.E. Russell, P.R. Manske // J. Orthop. Res. — 1990. — Vol. 8, № 1. — P. 13–20.
13. Stegemann H.J. A simple procedure for the determination of hydroxyproline in urine and bone / H.J. Stegemann // Biochem. Med. — 1952. — Vol. 3, № 1. — P. 23–30.
14. Uysal A.C. Tendon regeneration and repair with adipose derived stem cells / A.C. Uysal, H. Mizuno // Curr. Stem. Cell. Res. Ther. — 2010. — Vol. 5, № 2. — P. 161–167.