

# Вплив стовбурових клітин на відновлення ушкодженого сухожилка кролів

**Анотація.** Встановлено, що введення культури алогенних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку сприяє відновленню тканини загального п'яtkового сухожилка кролів під час експериментально змодельованого дегенеративно-некротичного процесу. При цьому спостерігаються виражені процеси регенерації тканин сухожилка, які проявлялись інтенсивним мітотичним діленням клітинних елементів у місці введення стовбурових клітин, формуванням колагенових волокон першого, другого і третього порядку і відновленням структурно-функціональної організації ушкодженого сухожилка.

**Ключові слова:** мезенхімальні стовбурові клітини, загальний п'яtkовий сухожилок, колагенові волокна, дипроспан.

*The influence of allogeneic mesenchymal of bone marrow stem cells on the activation of reparative processes in damaged common achilles tendon of rabbits. MYKOLA O. MALYUK, VICTORIA V. LISOVA (National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine).*

**Abstract.** Researched the indicators of absolute number of leukocytes and their subpopulations in the blood of rabbits and immunoregulatory index after administrating into their blood stream of xenogenic mesenchymal stem cells. Established that xenogenic mesenchymal stem cells do not possess immunogenic properties and show short-lived immunosuppressive effect, manifested in reducing of the absolute number of leukocytes and their subpopulations in their blood on the 3rd day of the experiment. Immunosuppressive effect of xenogenic mesenchymal stem cells vivo is most pronounced on the population of B-lymphocytes. Immunoregulatory index after administrating in vivo of xenogenic mesenchymal stem cells increases.

**Key words:** xenogenic mesenchymal stem cells, the absolute number of leukocytes, immunosuppressive action, T-lymphocytes, B-lymphocytes, immunoregulatory index.



**М. МАЛЮК, В. ЛІСОВА,**

кандидати ветеринарних наук

**Національний університет біоресурсів і природокористування України**

З ахворювання тварин з патологією опорно-рухового апарату представляють собою основну частину всіх випадків у ветеринарній клінічній практиці, за яких інтенсивно впроваджуються методи клітинно-регенеративної терапії. За статистикою дегенеративні ушкодження сухожилків займають чільне місце у патології опорно-рухового апарату тварин, зокрема у спортивних коней [5, 4].

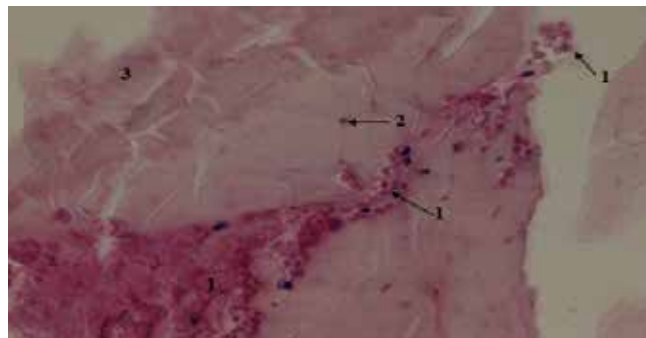
Експериментальними дослідженнями різних авторів доведено, що використання аутологічних МСК, плазми, збагаченої тромбоцитами і аутологічних фібробластів з терапевтичною метою у тварин при тендинітах зменшує початковий розвиток запаль-

ної реакції і утворення фіброзної тканини, стимулює внутрішнє зцілення за рахунок активної проліферації специфічних клітин, а також знижує можливість повторної травми [1, 6, 4]. Водночас, використання алогенного клітинного матеріалу для лікування тендопатій залишається недослідженим. З огляду на це, актуальним завданням є вивчення впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на репаративні процеси в експериментально ушкодженному сухожилку тварин.

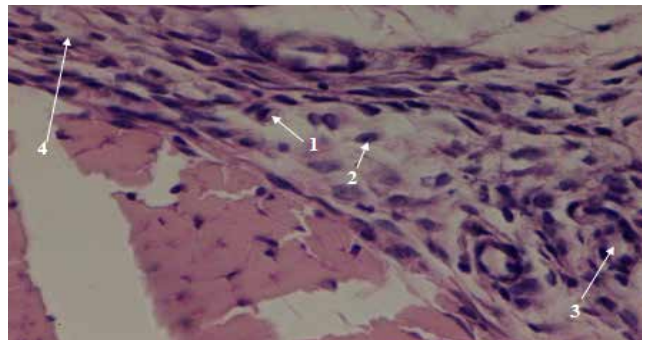
Meta роботи: вивчити вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку на перебіг репаративного процесу *in vivo* в експериментально ушкодженому загальному п'ятковому сухожилку кролів.

Мезенхімальні стовбурові клітини одержували із аспірату кісткового мозку стегнової кістки кролів [4]. Одержану клітинну масу культивували у стандартному середовищі: DMEM – 80 %, сироватка ембріонів телят – 20 % (виробництва “Sigma”, США) з додаванням 10 мкл/см<sup>3</sup> середовища антибіотика-антимікотика. Культивування проводили у CO<sub>2</sub>-інкубаторі за 37 °C та 5 % концентрації CO<sub>2</sub>. При цьому МСК осідали, прикріплюючись до поверхні культуральних чашок Петрі і розпластувалися. Суспензовану культуру гемопоетичних клітин згодом видаляли, після чого продовжували культивувати лише ті клітини, що мають адгезивні властивості. Після культивування отримували суспензію клітин, використовуючи 0,02 % розчин EDTA. Мікроскопічний аналіз і оцінку культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

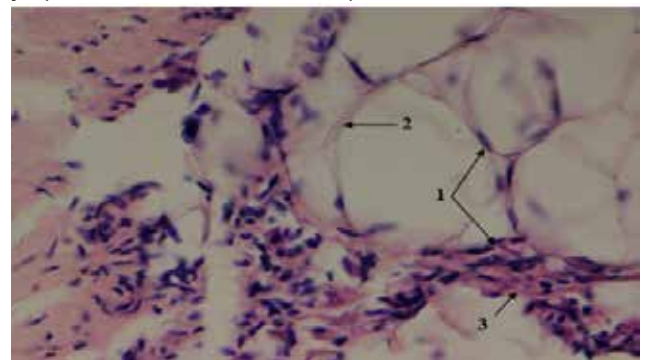
**Гістологічне дослідження загального п'яткового сухожилка кролів.** Контроль ефективності репаративних процесів у загальному п'ятковому сухожилку кролів проводили у декілька етапів. 1-й етап експериментального дослідження виконано на 8 кролях-самцях (I- контрольна група ; II- дослідна) масою



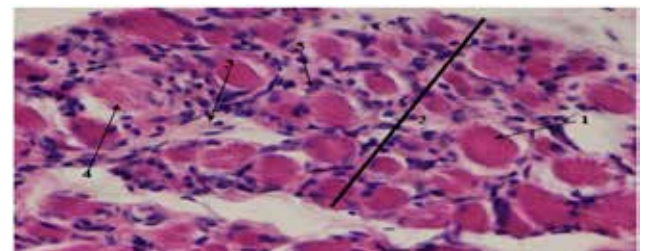
**Рис. 1.** Загальний п'ятковий сухожилок кроля на 7-му добу після введення фізіологічного розчину: 1 – розпад окремих ділянок пучків колагенових волокон на окремі фрагменти круглої форми; 2 – пікноз ядер теноцитів; 3 – некроз пучків колагенових волокон. Гематоксилін Караці та еозин, х 200



**Рис. 2.** Загальний п'ятковий сухожилок кроля на 7-му добу після введення стовбурових клітин: 1 – «молодий» фібробласт з ядром грушоподібною формою; 2 – «молодий» фібробласт з ядром овальної форми; 3 – новоутворений кровоносний капіляр; 4 – тяж новоутворених фібробластів. Гематоксилін Караці та еозин, х 200



**Рис. 3.** Загальний п'ятковий сухожилок кроля на 21-шу добу після введення фізіологічного розчину (місце введення дипроспану): 1 – теноцит; 2 – пучок колагенових волокон; 3 – міжклітинна речовина волокнистої структури. Гематоксилін Караці та еозин, х 200



**Рис. 4.** Загальний п'ятковий сухожилок кроля на 21-шу добу після введення стовбурових клітин (місце введення дипроспану): 1 – повністю сформований пучок колагенових волокон II-го порядку; 2 – повністю сформований пучок колагенових волокон III-го порядку; 3 – початкові стадія формування пучка колагенових волокон II-го порядку; 4 – пучок колагенових волокон II-го порядку з не досить щільно упакованими пучками I-го порядку; 5 – теноцити. Гематоксилін Караці та еозин, х 200

2,5 – 3,0 кг. З метою дегенеративно-дистрофічного ушкодження тканин сухожилка тваринам дослідної групи у товщу загального п'яткового сухожилка на 2,5 см проксимальніше від місця кріплення до п'яткової кістки вводили за допомогою інсулінової голки 0,25 мл дипроспану [2]. Інтервал між введенням дипроспану у дослідній групі тварин становив 7 діб. Тваринам дослід-



ної групи препарат вводили чотириразово. Через 7 днів після останнього введення препарату тварин виводили із дослідження.

2-й етап експериментального дослідження виконано на 16 кролях-самцях масою 2,5 – 3,0 кг, яким у товщу загального п'яткового сухожилка на 2,5 см проксимальніше від місця кріплення до п'яткової кістки вводили чотириразово за допомогою інсулінової голки 0,25 мл дипроспану. Через 7 днів після моделювання у кролів дегенеративно-дистрофічного ураження Ахіллового сухожилка тваринам одноразово в товщу сухожилка, на 2,5 см проксимальніше від п'яткового горба вводили: I- групи (контрольна) – 0,5 мл фізіологічного розчину; II групи (дослідна) – алогенні мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку в дозі  $2,5 \times 10^6$  клітин. Загальний об'єм введеної суспензії МСК становив 0,5 мл. Відбір проб тканин для гістологічних досліджень з вивчення впливу трансплантації алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на перебіг репаративних процесів в Ахілловому сухожилку кролів контрольної і дослідної групи проводили на 7-у і 21-у добу експерименту після місцевого введення алогенного клітинного матеріалу.

**Результати дослідження.** Алогенні МСК КМ застосовували з метою лікування дегенеративного ушкодження сухожилків у дослідних тварин на 2-му етапі експерименту. При проведенні гістологічних досліджень Ахіллового сухожилка кролів першої групи на 7-й день після введення фізіологічного розчину нами було встановлено наявність виразних мікроскопічних змін як безпосередньо в місці введення дипроспану, так і віддалено від нього. Сухожилок був дифузно набряклий. Пучки колагенових волокон блідо зафарбовувались еозином, а границі пучків колагенових волокон I-го порядку, зазвичай, не диференціювалися. Набрякова рідина при цьому відокремлювала один від одного переважно пучки колагенових волокон II-го порядку.

Тендиноцити на поверхні пучків колагенових волокон II-го порядку у багатьох випадках не виявлялися. На нашу думку, це може свідчити про загибель більшої частини цих клітин внаслідок дії дипроспану. Проте тендиноцити на поверхні пучків колагенових волокон III-го порядку в більшості випадків залишалися інтактними. У місці введення дипроспану крім того реєструвався лізис окремих фрагментів пучків колагенових волокон I-го та II-го порядку, що призводив до їх фрагментації.

Як показали результати проведених нами досліджень, такому лізису передувало розпаданню ділянок пучків колагенових волокон на окремі круглої форми фрагменти невеликих розмірів. Такі зміни нерідко супроводжувались некротичними змінами пучків колагенових волокон I-го і II-го порядку та пікнозом ядер тендиноцитів (рис. 1).

Проведені нами гістологічні дослідження також показали, що на 7-й день після застосування стовбурових клітин (тварини другої групи) мікроскопічні зміни в Ахілловому сухожилку мали істотні відмінності. Поза місцем введення дипроспану мікроскопічна будова цього сухожилка майже не відрізнялась від мікроскопічної будови Ахіллового сухожилка інтактних тварин. Єдина відмінність полягала в наявності незначного набряку між пучками колагенових волокон III-го порядку. Проте в місці введення дипроспану ще виявлялися мікроскопічні зміни, але їх характер істотно відрізнявся від характеру мікроскопічних змін у місці введення препарату в кролів, яким не вводили стовбурові клітини. Так, нами було встановлено, що у тварин другої дослідної групи, так як і в тварин першої, реєструвався набряк між пучками колагенових волокон II і III порядку. Проте в сухожилку вросли досить довгі клітинні тяжі. У місці введення стовбурових клітин у пучках колагенових волокон III порядку виявлялися осередки розмноження таких клітин. Ці осередки розмноження являли собою гетерогенну клітинну популяцію (рис. 2).

В той же час у периферійній частині цих скупчень виявлялися морфологічні ознаки клітинної диференціації. Частина стовбурових клітин мала округлу форму та невелику за об'ємом дещо базofilну цитоплазму. На нашу думку, такі синтетичні процеси в даному випадку були пов'язані з ростом і диференціацією стовбурових клітин, оскільки у подальшому реєструвалося збільшення об'єму цитоплазми, а самі клітини спочатку набували грушоподібної, а потім – фібробластоподібної форми. Всі ці клітини, крім того, мали надзвичайно інтенсивно зафарбовані ядра, що характерно для незрілих клітин, які інтенсивно розмножуються.

У периферійних частинах Ахіллового сухожилка на 7-му добу після введення стовбурових клітин формувалися осередки скупчення фібробластів, серед яких виявлялися ще молоді клітини, які мали ядра грушоподібної чи овальної форми. У такі скупчення клітин проростали кровоносні капіляри, а всередину

сухожилка вросли тяжі новоутворених фібробластів (рис. 2). Клітини у таких тяжах розташовувались досить щільно, але місцями вже реєструвалося продукування цими клітинами помітної кількості міжклітинної речовини, яка, на нашу думку, могла являти собою новоутворені, ще невпорядковано розташовані пучки колагенових волокон.

На 21-у добу у кролів першої дослідної групи, яким не вводили стовбурових клітин, мікроскопічна будова загального п'яткового сухожилка, віддаленого від місця введення дипроспану не відрізнялась від мікроскопічної будови загального п'яткового сухожилка контрольних тварин. Проте у місці введення дипроспану ще виявлялися досить виразні мікроскопічні зміни. Пучки колагенових волокон зафарбовувалися еозином більш блідо порівняно з контролем. У самому місці введення виявлялась виразна проліферація тендиноцитів. При цьому в одних ділянках вони утворювали суцільні клітинні поля з наявністю відносно невеликої кількості еозинофільної міжклітинної речовини з не сильно вираженою волокнистою будовою. В інших ділянках тендиноцити і пучки колагенових волокон формували сіткоподібну структуру.

У подальшому вздовж пучків колагенових волокон цієї структури починалося розмноження тендиноцитів і продукування ними міжклітинної речовини волокнистої структури (рис. 3). У місці введення дипроспану подекуди виявлялось формування пучків II і III порядку. Проте новоутворені пучки ще були досить тонкими, не мали чіткої орієнтації пучків колагенових волокон, містили велику кількість невпорядковано розташованих тендиноцитів, а між ними виявлявся виразний набряк.

Проведені нами гістологічні дослідження також показали, що при застосуванні стовбурових клітин на 21 добу мікроскопічні зміни в загальному п'ятковому сухожилку мали істотні відмінності. Поза місцем введення дипроспану мікроскопічна будова цього сухожилка вже не відрізнялась від мікроскопічної будови Ахіллового сухожилка інтактних тварин. Водночас, у місці введення дипроспану ще виявлялися мікроскопічні зміни, але їх характер істотно відрізнявся від характеру мікроскопічних змін Ахіллового сухожилка кролів першої дослідної групи. Пучки колагенових волокон I, II і III порядків вже були чітко сформовані. При цьому пучки колагенових волокон I, II і III порядків вже мали чітку орієнтацію, яка відповідала орієнтації цих пучків у ділянках Ахіллового сухожилка віддалено від місця введення дипроспану. Лише місцями виявлялися поодинокі пучки колагенових волокон II порядку на початкових стадіях свого формування та поодинокі пучки колагенових волокон II порядку з не досить щільно упакованими пучками I порядку. Крім того, у місці введення дипроспану ще реєструвалась велика кількість тендиноцитів (рис. 4).

## Висновок.

Внутрішньосухожилкове введення культури алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у дозі  $2,5 \times 10^6$  при експериментально змодельованому дегенеративно-некротичному ушкодженні активізує процеси репаративного відновлення тканин сухожилка, про що свідчать виражені процеси регенерації тканин загального п'яткового сухожилка на 7- у та 21-у добу, які проявлялись інтенсивним мітотичним діленням клітинних елементів у місці введення стовбурових клітин, формуванням колагенових волокон першого, другого і третього порядку і відновленням структурно-функціональної організації загального п'яткового сухожилка.

## ЛІТЕРАТУРА

1. **Блонський Р. І.** Клітинна терапія при дегенеративних ушкодженнях сухожиль. / Р. І. Блонський // Дис. канд. мед. наук. Київ – 2011. – С. 173.
2. **Коструб О.О.** Клітинна терапія при дегенеративних ушкодженнях сухожиль. / О.О. Коструб, Р.І. Блонський // К. – 2011. – Здоров'я. – С. 151.
3. Патент на корисну модель № 86839 «Спосіб прижиттєвого отримання кісткового мозку у дрібних тварин» Бюл. № 1 від 10.01.2014 Мазуркевич А.Й., Малюк М.О., Ткаченко С.М., Харкевич Ю.О.
4. **Alves AG.** Cell-based therapies for tendon and ligament injuries. / A. G. Alves, A. A. Stewart, J. Dudhia, et al. // *Vet Clin North Am Equine Pract* 2011. – Vol. 27(2). – P. 315-333.
5. **Richardson L. E.** Stem cells in veterinary medicine - attempts at regenerating equine tendon after injury. / L. E. Richardson, J. Dudhia, P. D. Clegg et al. // *Trends Biotechnol.* – 2007. – Vol. 25. – № 9. – P. 409-416.
6. **Schnabel L.V.** Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons / L. V. Schnabel, M. E. Lynch, M. C. Meulen et al // *J Orthop Res* 2009;27(10):1392-1398.

