

УДК 616.758-085.36-092.9:576

Клітинні культури стромального походження в терапії експериментальної тендопатії

Н. О. Волкова¹, О. О. Коструб², Р. І. Блонський², О. І. Гончарук¹,
А. Т. Бруско², О. В. Павлович¹, М. С. Юхта¹

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

² ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ

The article deals with a comparative study of the use of cell cultures of the stromal origin for treating degenerative-dystrophic damages of the Achilles tendon in rats. With help of histological and biomechanical methods it is shown that a local introduction of cultures of bone marrow mesenchymal stromal cells and chorion cells facilitates restoration of the damaged structure of tendons and normalization of their strength.

Представлено сравнительное исследование применения клеточных культур стромального происхождения для лечения дегенеративно-дистрофического повреждения ахилловых сухожилий у крыс. При помощи гистологических и биомеханических методов показано, что локальное введение культур мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и клеток хориона способствует восстановлению поврежденной структуры сухожилий и нормализации их прочности.

Ключові слова: тендинопатія, стромальні клітини, клітинна терапія

Тактика лікування хворих з дегенеративним ушкодженням сухожилків на сьогодні не має чіткого патогенетично обґрунтованого алгоритму та характеризується неузгодженим застосуванням різних методів лікування та їх низькою ефективністю. Це зумовлено втратою дегенеративно зміненою тканиною сухожилка біофізичних, біохімічних та біологічних властивостей (міцності, пружності, еластичності, рН, швидкості біохімічних процесів, мітотичної активності тощо). Порушення мікроциркуляції та іннервації призводить до значного зменшення регенеративної здатності тканини сухожилка внаслідок неможливої міграції до зони ушкодження стовбурових клітин, клітин крові та факторів росту. У зв'язку з цим нині одним із перспективних шляхів у лікуванні дегенеративного ушкодження сухожилків є впровадження в медичну практику досягнень молекулярної та клітинної біології, зокрема використання аутологічної збагаченої тромбоцитами плазми, культивованих аутологічних та алогенних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) кісткового мозку, аутологічних фібробластів дерми, а також стромальних культур клітин з тканин

фетоплацентарного комплексу (фетальні фібробласти, культура клітин зі складових плаценти) [1–11].

Під час проведення експериментального дослідження ми вибрали такі об'єкти, як МСК, отриманих з кісткового мозку і тканини хоріону. Загальновідомо, що МСК ідентифікують за їх здатністю адгезувати до основи пластику *in vitro*, диференціюватися в різні типи тканин, за комбінацією експресії поверхневих клітинних маркерів (CD 105, CD 73, CD 90) та відсутності інших (CD 34, CD 45) [4–5]. Згідно з даними авторів [7, 11] МСК фетального походження та дорослого організму мають однакові фенотипічні характеристики. Культури клітин хоріону (ККХ) характеризуються фібробластоподібною морфологією, стабільним коефіцієнтом проліферації та здатністю до спрямованої диференціації в адіпогенному, хондрогенному та остеогенному напрямках, що свідчить про наявність популяції клітин зі стовбуровими властивостями [7, 10, 11]. За вказаними характеристиками вважаємо, що ККХ можуть бути порівняними з МСК кісткового мозку. Таким чином, МСК кісткового мозку та ККХ є пластичними культурами

з ознаками стовбурових стромальних клітин, що визначає перспективу їхнього використання для відновлення ушкоджених кісткової, хрящової, м'язової та інших тканин мезенхімального походження.

Метою представленої роботи було дослідити можливість застосування культур стромального походження для корекції тендопатії у експериментальних тварин.

Матеріал та методи

Дослідження виконано на 56 статевозрілих щурів-самцях (6 дослідних груп по 7 тварин у кожній) з масою (250 ± 30) г. Усі маніпуляції з тваринами здійснювали відповідно до вимог біоетики та принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою, а також «Загальними принципами експериментів на тваринах», схваленими на II Національному конгресі по біоетиці (20.09.2004 р., Київ, Україна).

У роботі використовували культивовані автологічні МСК, які отримували з резектованого фрагмента клубової кістки щурів. Клітини виділяли шляхом вимивання за допомогою розчину Хенксу (РАА, Австрія) з подальшим пропусканням крізь голки з діаметром, що поступово зменшувався. Наступний етап включав центрифугування з 1500 об/хв (834 г) протягом 5 хв. Отриману суспензію клітин ресуспендували в живильному середовищі і висівали у культуральних флаконах.

Дослідні тканини хоріону отримували з абортивного матеріалу (договір про наукову співпрацю між ДП «Міжвідомчий науковий центр НАН, НАМН і МОЗ України» та Інститутом проблем кріобіології і кріомедицини НАН України) у тих випадках, коли вагітність переривали за відсутності патології розвитку чи інфікування ембріону. Суспензію клітин ворсинчастої частини тканини хоріону людини 6–8 тижнів гестації одержували шляхом ферментативної холодової дезагрегації [12] з подальшим культивуванням.

У ході культивування обох культур щільність посіву клітин становила 10^3 клітин на cm^2 культурального флакону площею 25 cm^2 (РАА, Австрія). Культивування клітин проводили за методом, що забезпечує адгезію стромальної фракції до пластику з подальшим видаленням фракції неадгезованих клітин. Живильне середовище для культивування містило: середовище IMDM («Sigma», США), 10 % ембріональну сироватку великої рогатої худоби («HyClone», США), гентаміцин (150 мкг/мл, «Фармак», Україна) та амфотеріцин Б (10 мкг/мл, «Sigma-Aldrich»). Середовище культивування

змінювали кожні 3 доби. Умови культивування — температура 37°C в атмосфері 5 % CO_2 з використанням інкубатора («Sanyo», Японія).

Для моделювання тендопатії експериментальним тваринам у товщу ахіллового сухожилка на $0,25 \text{ cm}$ проксимальніше п'яtkового горба чотириразово з інтервалом 7 діб вводили за допомогою інсулінової голки по $0,025 \text{ ml}$ розчину дипроспану [13]. Через 7 діб після останньої ін'єкції дипроспану в обидва дегенеративно-дистрофічно змінені сухожилки контрольних тварин вводили $0,1 \text{ ml}$ фізіологічного розчину, тварин дослідної групи № 1 — $0,25 \cdot 10^6$ ККХ; дослідної групи № 2 — $0,25 \cdot 10^6$ МСК кісткового мозку. Клітини вводили у фізіологічному розчині. Згідно зі схемою експерименту була також група інтактних тварин (14 щурів), яким не проводили жодних маніпуляцій. Після виконання клітинної терапії тварин виводили з експерименту на 7-у та 21-у добу шляхом застосування летальних доз ефіру для наркозу. З метою гістологічного дослідження та встановлення міцності вилучали ахіллів сухожилок разом з місцем кріплення до горба п'яtkової кістки. Міцність сухожилків, а саме показник руйнівного навантаження за умов розтягування сухожилків, вимірювали за нашим методом [14]. Для статистичної обробки результатів застосовували однофакторний дисперсійний аналіз і t-критерій Ст'юдента з використанням програми Excel.

Результати та їх обговорення

Візуальні дослідження сухожилків тварин з та без лікування виявили суттєву різницю між групами. У тварин контрольної групи під час розтину відмічали неоднорідність структури сухожилка: значне стоншення з наявністю в окремих ділянках потовщень. У тварин усіх експериментальних груп з терапією патологічних змін не виявлено.

Під час мікроскопічного дослідження гістологічних препаратів сухожилків тварин контрольної групи на 7-у добу після введення в товщу сухожилка фізіологічного розчину спостерігали погіршення тинкторіальних якостей сухожильної тканини, що проявлялося послабленим фарбуванням сухожилкових волокон та тендиноцитів (рис. 1, а). Спостерігали локуси хвилястості та дезорганізації сухожилкових волокон і відсутність клітинних елементів сухожилка. Контури сухожильних волокон були нечіткими.

У тварин дослідної групи № 1 на 7-у добу після проведення терапії з використанням ККХ у сухожилках відмічали значне збільшення кількості клітинних елементів у зоні дегенеративно-дистрофічного процесу та разом з тим посилення інтенсивності їх

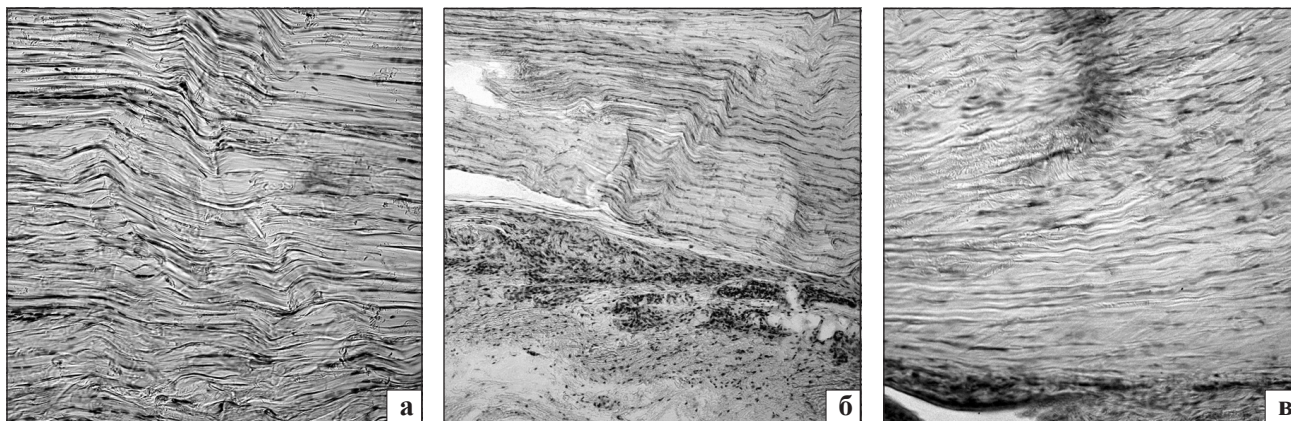


Рис. 1. Мікрофото ділянок ахіллових сухожилків через 7 діб після введення фізіологічного розчину (а), ККХ (б), МСК кісткового мозку (в). Гематоксилін та еозин. Зб. 200

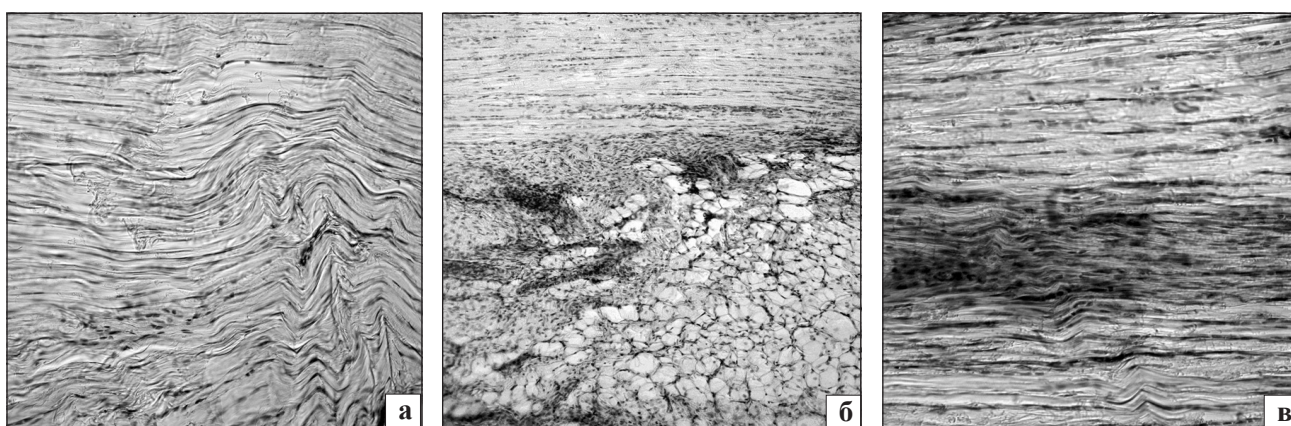


Рис. 2. Мікрофото ділянок ахіллових сухожилків через 21 добу після введення фізіологічного розчину (а), ККХ (б), МСК кісткового мозку (в). Гематоксилін та еозин. Зб. 200

фарбування, що характерно для активізації диференціації клітинних елементів (рис. 1, б). Крім того, спостерігали міграцію клітинних елементів до осередку дегенеративно-дистрофічного процесу та явища ексудації. При цьому хвилястість і дезорганізація сухожилкових волокон зберігалися, супроводжуючись покращенням їх фарбування. Усі зазначені вище зміни характеризують високу інтенсивність диференціації клітинних елементів та збільшення їх проліферативної активності.

У тварин дослідної групи № 2 через 7 діб після введення в товщу ахіллового сухожилка культури МСК кісткового мозку на фоні патологічних змін відмічали значне збільшення кількості клітинних елементів у зоні дегенеративно-дистрофічного процесу та посилення інтенсивності їх фарбування, що є характерним для активної диференціації клітин (рис. 1, в). Хвилястість та дезорганізація сухожилкових волокон у самій зоні дегенеративно-дистрофічного процесу залишалися, але супроводжувалися більшою інтенсивністю їх фарбування. Таким чином, усі зафіксовані в сухожилках тва-

рин на 7-у добу після терапії зміни характерні для посилення процесів проліферативної активності та диференціації клітинних елементів в осередку патологічного процесу.

На 21-у добу спостереження у тварин контрольної групи в ахілловому сухожилку відмічали наростання патологічних змін (рис. 2, а): нерівномірність забарвлення матриксу, відсутність клітинних елементів, хвилястість та збільшення дезорганізації сухожилкових волокон.

Мікроскопічне дослідження сухожилків на 21-у добу після введення ККХ показало різке збільшення кількості та інтенсивності фарбування клітинних елементів, міжклітинної речовини сухожилкових волокон у патологічному осередкові (рис. 2, б). При цьому контури сухожилкових волокон були чіткішими, зменшувалися їх хвилястість та дезорганізація, що характеризує високу активність проліферативних процесів в ушкодженому сухожилку після введення в його товщу ККХ. На 21-у добу в сухожилках тварин з введенням МСК кісткового мозку виявляли збільшення кількості та інтенсивності фарбування

Таблиця. Міцність дегенеративно-дистрофічно змінених сухожилків на розтягування у тварин з терапією ККХ та МСК кісткового мозку, МПа

Дослідна група	Термін спостереження	
	7-а доба	21-а доба
Норма (інтактні тварини)	8,49 ± 0,07	8,49 ± 0,05
Контроль (фізіологічний розчин)	3,26 ± 0,04*	2,68 ± 0,06*
Застосування ККХ	4,32 ± 0,05**	5,47 ± 0,03*, **
Застосування МСК кісткового мозку	5,08 ± 0,06*, **	6,75 ± 0,08*, **

Примітки: * — вірогідні відмінності стосовно інтактної групи тварин, $p < 0,05$; ** — вірогідні відмінності стосовно контрольної групи тварин, $p < 0,05$

клітинних елементів і міжклітинної речовини, сухожилкових волокон зі зменшенням ознак їх хвилястості та дезорганізації (рис. 2, в). Наведені зміни в сухожилках тварин з терапією характеризують високу проліферативну активність клітин в осередку патологічного вогнища.

Таким чином, результати гістологічного дослідження свідчать, що за умов дегенеративно-дистрофічного ураження сухожилка локальне введення аутологічної культури МСК кісткового мозку та ККХ позитивно впливає на реституцію структурно-функціонального стану тканини сухожилка, що проявлялося у припиненні прогресування дегенеративно-дистрофічних змін, активізації процесів проліферації та репарації в зоні ушкодження з ознаками регенераторного відновлення гістологічної структури тканини сухожилка. Слід зазначити, що ці гістологічні картини змін в сухожилках тварин з введенням ККХ схожі з регенеративними процесами, що перебігають у сухожилках тварин з терапією МСК кісткового мозку. Однак у випадку застосування МСК кісткового мозку картина відновлення ушкоджених сухожилків мала виразніший характер.

Для оцінювання міцності сухожилків до та після застосування ККХ та МСК кісткового мозку проводили визначення руйнівного навантаження за умов розтягування. Отримані результати представлені в таблиці. У тварин контрольної групи міцність сухожилків зменшувалася та була вірогідно нижчою, ніж у інтактних тварин у всі строки спостереження. Застосування ККХ призводило до збільшення міцності на 7-у добу в 1,3 рази, на 21-у — в 2 рази порівняно з відповідними показниками у контрольній групі тварин. Виразніші зміни міцності сухожилків спостерігали у тварин з терапією МСК, а саме: зростання в 1,6 рази на 7-у добу та в 2,5 рази — на 21-у порівняно з контрольною групою тварин. Слід зазначити, що показник руйнівного навантаження у разі розтягування сухожилків в усіх дослідних групах був вірогідно нижчим, ніж відповідний показник в інтактних тварин.

Отже, на сьогодні існує широкий спектр потенціальних напрямків отримання МСК та їх терапев-

тичного застосування. У представленій роботі показано, що локальне введення ККХ та МСК кісткового мозку в зону ушкодження сухожилка призводило до відновлення гістологічної структури ушкодженої тканини і супроводжувалося тенденцією до нормалізації міцності. Зазначимо, що у випадку застосування МСК кісткового мозку репаративні процеси мали інтенсивніший характер, що виражалося більшою кількістю клітинних елементів у патологічному осередковому сухожилку та зростанням динаміки показника міцності. Наші дані узгоджуються з результатами, які отримані під час порівняння характеристик стромальних клітин, що походять з різних джерел. За наявності на поверхні цих клітин подібного спектру антигенних детермінант їх здатність до проліферації та диференціації відрізнялася [16, 17].

Висновки

Встановлено принципову можливість застосування культур стромального походження для відновлення дегенеративно-дистрофічно змінених сухожилків у експериментальних тварин за умов локального введення. Виявити вплив МСК кісткового мозку та ККХ на динаміку відновлення ушкоджених сухожилків є завданням для подальшого детального вивчення в більш віддалені строки з визначенням частки трансплантованих клітин.

Роботу проведено у межах цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (договір № 2.2.6.69).

Список літератури

1. Кухарчук А. Л. Регенеративная медицина: направления, достижения, проблемы и перспективы / А. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сирман // Украинский медицинский журнал. — 2004. — № 4. — С. 114–121.
2. Гончарук Е. И. Криоконсервированные клетки хориона — перспективный объект для биотехнологии / Е. И. Гончарук // Проблемы криобиологии. — 2008. — Т. 18, № 4. — С. 459–461.
3. The effects of bone marrow stromal cell transplants on tendon healing in vitro / Ch. Zhao, H. Chieh, K. Bakri et al. // Medical Engineering & Physics. — 2009. — Vol. 31. — P. 1271–1275.

4. Восстановление структуры сухожилий с применением биоматериалов Аллоплант / Э. Р. Мулдашев, Р. Т. Нигматуллин, В. Г. Гафаров и др. // Регенеративная хирургия. — 2005. — № 1. — С. 56–61.
5. Ромпе Ян Д. Травматизм сухожилий и методы восстановительной терапии / Ян Д. Ромпе, Д. Фьюриа, Н. Маффулли // Журнал костно-суставной хирургии. — 2008. — № 3. — С. 15–19.
6. Alhadlaq A. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics / A. Alhadlaq // Stem. Cells. Dev. — 2004. — Vol. 13, № 4. — P. 436–448.
7. Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy / G. Bilic, S. M. Zeisberger, A. S. Mallik et al. // Cell Transplant. — 2008. — Vol. 17, № 8. — P. 955–68.
8. Klingemann H. Mesenchymal stem cells — sources and clinical applications / H. Klingemann, D. Matzilevich, J. Marchand // Transfus. Med. Hemother. — 2008. — Vol. 35. — P. 272–277.
9. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells / R. Bittencourt, H. Pereira, S. Felisbino et al. // Acta Ortop. Bras. — 2006. — Vol. 14, № 1 — P. 22–24.
10. Establishment of human trophoblast progenitor cell lines from the chorion / O. Genbacev, M. Donne, M. Kapidzic et al. // Stem Cells. — 2011. — Vol. 29, № 9. — P. 1427–1436.
11. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane / S. Dnaz-Prado, E. Muicos-Lypez, T. Hermida-Gymez et al. // J. Cell Biochem. — 2010. — Vol. 111, № 4. — P. 846–857.
12. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков / Р. Адамс. — М.: Мир, 1983. — 264 с.
13. Модель дегенеративно-дистрофічного ураження сухожилля (експериментальне дослідження) / О. О. Коструб, А. Т. Бруско, Р. І. Блонський, В. Б. Заєць // Вісник ортопедії, травматології та протезування — 2009. — № 3. — С. 26–28.
14. Міцність сухожилля на розтягування після клітинної терапії його дегенеративного пошкодження в експерименті / О. О. Коструб, Р. І. Блонський, І. А. Лазарев и др. // Вісник ортопедії, травматології та протезування — 2011. — № 3. — С. 23–26.
15. Hegyi B. Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall / B. Hegyi, B. Sa'gi1, J. Kova'cs // Int. Immunology. — Vol. 22, № 7. — P. 551–559.
16. Baksh D. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow / D. Baksh, R. Yao, R. Tuan // Stem cells. — 2007. — Vol. 25. — P. 1384–1392.
17. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon / H. A. Awad, D. L. Butler, G. P. Boivin et al. // Tissue Eng. — 1999. — Vol. 5. — P. 267–277.
18. Lee E. H. The potential of stem cells in orthopedic surgery / E. H. Lee, J. H Hui // J. Bone Joint Surg. — 2006. — Vol. 88. — P. 841–851.

Стаття надійшла до редакції 28.04.2012