

DOI

УДК 617.615.361.616

ВЛИЯНИЕ КЛЕТОК СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ НА РЕПАРАТИВНУЮ РЕГЕНЕРАЦИЮ ИНДУЦИРОВАННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ АХИЛЛОВА СУХОЖИЛИЯ

Слесаренко Наталья Анатольевна, д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой «Анатомия и гистология животных им. профессора А. Ф. Климова», ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина».

109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23.

E-mail: slesarenko2009@yandex.ru

Жариков Алексей Михайлович, аспирант кафедры «Анатомия и гистология животных им. профессора А. Ф. Климова», ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина».

109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23.

E-mail: am.zharikov@gmail.com

Ключевые слова: фракция, регенерация, повреждение, сухожилие, преобразование, продукт, суспензия.

Цель исследований – морфологическое обоснование эффективности применения клеточных продуктов при разрыве ахиллова сухожилия. Среди клеточных препаратов наибольшей биологической безопасностью отличаются аутологичные. Из них в клинической практике положительно зарекомендовали себя клетки стромально-васкулярной фракции и мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, обладающие способностью к самоподдержанию, дифференцировке в различные клеточные типы и мобилизующие в тканях репаративный процесс. Практически отсутствуют сведения о динамическом морфологическом контроле процесса репарации при их применении. Оценено влияние стромально-васкулярной фракции из жировой ткани крыс на регенеративные процессы при заживлении дефекта, выражающееся в снижении риска возникновения рецидивов, упорядоченной архитектонике волокон плотной оформленной соединительной ткани и активации формирования и созревания грануляционной ткани. На основании данных о положительном влиянии исследуемого клеточного продукта на регенерацию ахиллова сухожилия научно обоснована целесообразность его применения в ветеринарной медицине. Экспериментальная модель исследования – декоративная крыса (n=20). Материал для исследования – ахиллово сухожилие. Использовали комплекс методов, включающих анатомическое препарирование, экспериментальное моделирование, гистологическое исследование биоптатов ахиллова сухожилия. Выявлено, что у подопытных животных, которым вводили данный клеточный продукт, обнаружены микроморфологические преобразования соединительной ткани, направленные на упорядоченность фиброархитектоники и утолщения пучков коллагеновых волокон. Стимулирующее влияние стромально-васкулярной фракции на репаративные процессы дефекта ахиллова сухожилия выражается в большей степени васкуляризации ткани и увеличении количества фибробластов у групп подопытных животных, в то время как у животных контрольной группы упорядоченность волокон нарушена, что способствует возникновению рецидивов.

INFLUENCE OF STROMAL-VASCULAR FRACTION CELLS ON REPARATIVE REGENERATION OF INDUCED ACHILLES TENDON INJURY

N. A. Slesarenko, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the department «Animal Anatomy and Histology named after Professor A. F. Klimov», Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K. I. Scriabin.

109472, Moscow, Academician Scriabin street, 23.

E-mail: slesarenko2009@yandex.ru

A. M. Zharikov, Graduate Student of the Department «Animal Anatomy and Histology named after Professor A. F. Klimov», Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K. I. Scriabin.

109472, Moscow, Academician Scriabin street, 23.

Email: am.zharikov@gmail.com

Keywords: fraction, regeneration, damage, tendons, transformation, product, suspension.

The purpose of the research is to provide a morphological justification of the effectiveness of cell products in Achilles tendon rupture. Autologous drugs have the highest biological safety among cellular drugs. Out of these, stromal-

vascular cells and multipotent mesenchymal stem cells that have the ability to support themselves, differentiate into different cell types, and mobilize the reparative process in tissues have been positively recommended for clinical practice. Almost there's no information about the dynamic morphological process control and reparations in their application. The impact of stromal-vascular fraction of rat adipose tissue on the regenerative process in the healing of the defect, which is expressed in reducing the risk of recurrence, peaceful architectonics fibers shaped dense connective tissue and activate the formation and maturation of granulation tissue have been evaluated. Based on the data on the positive effect of the studied cell product on the regeneration of the Achilles tendon, scientifically grounded its feasibility and use in veterinary medicine. The experimental model of the study is a fancy rat (n=20). The material for the study is the Achilles tendon. A set of methods including anatomical dissection, experimental modeling, and histological examination of Achilles tendon biopsies have been used. It was revealed that in experimental animals which were injected with this cell product, micromorphological transformations of connective tissue were detected, aimed affected the fibroarchitectonics and thickening of bundles of collagen fibers. The stimulating effect of the stromal-vascular fraction on the reparative process of the Achilles tendon defect is expressed in a greater degree of vascularization of the tissue and an increase in the number of fibroblasts in groups of experimental animals, while in animals of the control group, the regulating of fibers is disturbed, which contributes to the recurrences.

Одним из направлений в регенеративной медицине является использование аутологичных клеточных продуктов, действие которых направлено на оптимизацию регенераторного процесса в зоне повреждения [1, 5, 7].

Среди клеточных препаратов наибольшей биологической безопасностью отличаются аутологичные. Из них в клинической практике положительно зарекомендовали себя клетки стромально-васкулярной фракции (СВФ) и мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК), обладающие способностью к самоподдержанию, дифференцировке в различные клеточные типы и мобилизующие в тканях репаративный процесс. Однако для внедрения клеточной терапии в ветеринарную практику требуется научное обоснование, основанное на комплексных экспериментальных исследованиях, являющихся базовыми для оценки возможностей применения аутологичных клеточных продуктов для восстановления анатомической целостности органов, поддержания структурного гомеостаза, профилактики рубцовых изменений в травмированной зоне, а также конкретизации показаний к применению и разработки схем лечения [3, 5, 6, 7].

Вместе с тем, практически отсутствуют сведения о динамическом морфологическом контроле процесса репарации при их применении [2, 4].

Цель исследований – морфологическое обоснование эффективности применения клеточных продуктов при разрыве ахиллова сухожилия.

Задачи исследований: 1) установить особенности анатомической организации ахиллова сухожилия у крыс; 2) представить морфологическую характеристику спонтанного заживления индуцированного повреждения сухожильной ткани; 3) охарактеризовать микроморфологическое состояние регенерата ахиллова сухожилия подопытной группы в динамике восстановительного процесса (на 7, 14, 30 и 60 сутки) под влиянием СВФ.

Материал и методы исследования. Исследования выполнены на базе кафедры анатомии и гистологии животных имени профессора А. Ф. Климова ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К. И. Скрябина и ООО «Центр ветеринарной клеточной медицины» на двух группах декоративных крыс разновидности «Стандарт» (контрольной и подопытной), подобранных по принципу аналогов.

Экспериментальные группы были сформированы из клинически здоровых животных с учетом происхождения, пола (самцы), возраста, живой массы. Животных карантировали в течение 14 суток, проводили общеклиническое исследование. Использовали комплекс методов, включающих анатомическое препарирование, экспериментальное моделирование, гистологическое исследование биоптатов ахиллова сухожилия. В контрольной группе область повреждения заживала естественным путем, а в подопытной группе – под влиянием аутологичных клеток стромально-васкулярной фракции. Травму моделировали посредством поперечного разреза дистальной трети ахиллова сухожилия, ближе к месту прикрепления к пяточной кости заплюсны. В условиях полного расслабления мышц область повреждения сухожилия сшивали специальным швом.

Животным подопытной группы стромально-васкулярную фракцию вводили однократно в объеме 1 мл подкожно в область дефекта на расстоянии 5 мм от области травмы с двух сторон. У крыс контрольной группы область повреждения регенерировала самопроизвольно.

Проводили динамическое наблюдение за животными до момента выведения из эксперимента, которое осуществляли на 7, 14, 30 и 60 сутки путем эвтаназии в соответствии с требованиями этического комитета. Все манипуляции с лабораторными животными проводили согласно «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных научных целей» (Страсбург, 18 марта 1986 г. ETS №123) после выдерживания двухнедельного карантина. Для гистологических исследований образцы фиксировали в 10% нейтральном формалине. После фиксации образцы промывали водопроводной водой (24 часа), обезжизивали в спиртах возрастающей крепости (от 50% до 100%) и заливали в парафин-воск.

Серийные парафиновые срезы толщиной 5-10 мкм изготавливали на универсальном автоматизированном микротоме «НМ-360» (Mikron, Германия).

Изучение общей морфологической картины проводили при помощи светового микроскопа «Nikon» (Япония) после окраски гистологических срезов гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону по общепринятым методикам.

Результаты исследований. На основании данных анатомического препарирования установлено, что в формировании ахиллова сухожилия у крыс участвуют: пяточные ветви двуглавой и полусухожильной мышцы, латеральная и медиальная икроножные мышцы и поверхностный сгибатель пальцев (рис. 1-4).



Рис. 1. Макроморфология пяточных ветвей двуглавой мышцы, участвующих в формировании ахиллова сухожилия



Рис. 2. Макроморфология пяточных ветвей полусухожильной мышцы, участвующей в формировании ахиллова сухожилия



Рис. 3. Макроморфология латеральной и медиальной икроножных мышц, участвующих в формировании ахиллова сухожилия



Рис. 4. Макроморфология поверхностного сгибателя пальцев, участвующего в формировании ахиллова сухожилия

На основании результатов микроморфологического исследования регенерата ахиллова

сухожилия животных установлено, что у животных подопытной группы на 7 сутки пучки коллагеновых волокон в зоне дефекта характеризуются упорядоченной ориентацией, в то время как у животных в группе контроля они разнонаправлены. Это может свидетельствовать о стимуляции регенеративных процессов в области индуцированного повреждения при введении стромально-васкулярной фракции (рис. 5).

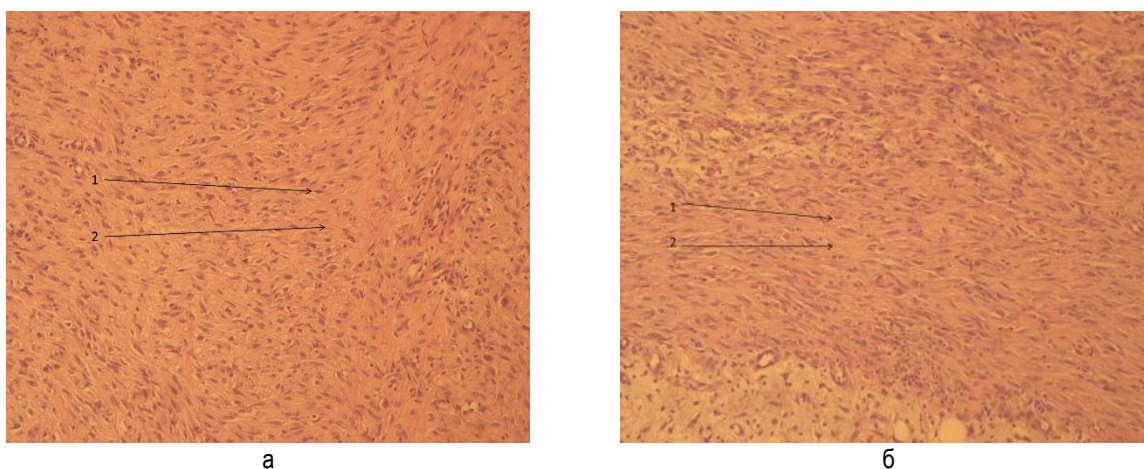


Рис. 5. Микроморфологическая картина регенерата сухожилия на 7 сутки (гематоксилин и эозин, об. 20, ок. 10):
а – контроль; б – подопытная группа; 1 – теноциты; 2 – коллагеновые волокна

При сравнительном анализе регенерата сухожилия на 14 сутки было установлено, что у животных подопытной группы, которым вводили аутологичный клеточный продукт, четко выражено взаимно параллельное расположение коллагеновых волокон с видимыми границами дифференциации на пучки первого и второго порядков. Более того, волокна приобретают волнистый ход, что может свидетельствовать о наличии у них резерва длины при натяжении. У крыс в контрольной группе на 14 суток наблюдений пучки волокон сохраняют разнонаправленную организацию, что может свидетельствовать о риске возможных рецидивов. Кроме того, микроморфологическая картина сухожилия в подопытной группе характеризуется увеличением, по сравнению с контролем, клеток соединительной ткани, а также толщины пучков коллагеновых волокон. Все это отражает стимулирующее влияние аутологичной суспензии клеток СВФ на репарацию ткани сухожилия (рис. 6).

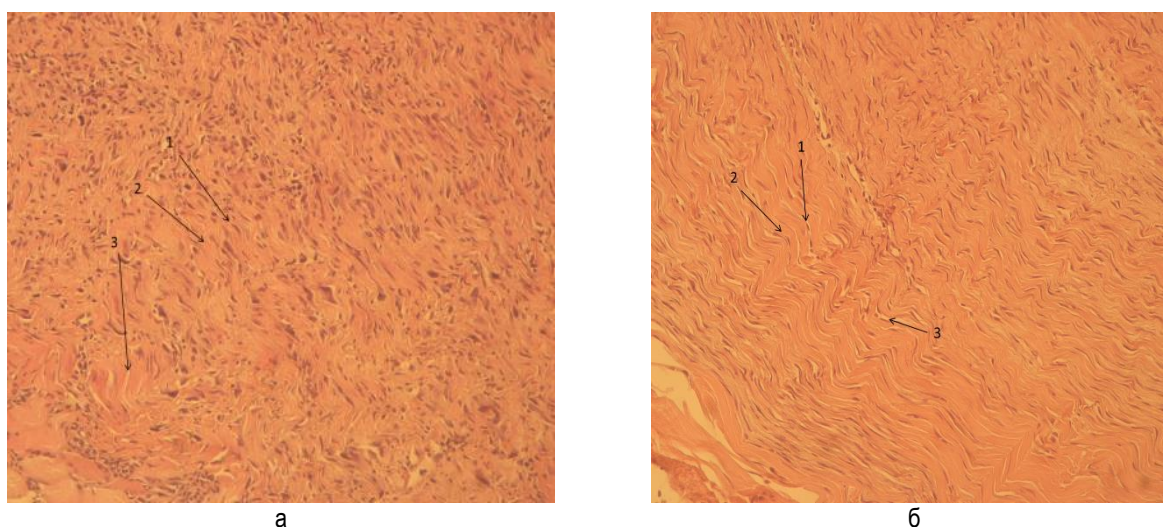


Рис. 6. Микроморфологическая характеристика регенерата сухожилия на 14 сутки (гематоксилин и эозин, об. 20, ок. 10):
а – контроль; б – подопытная группа; 1 – теноциты; 2 – коллагеновые волокна; 3 – эндотелий

На 30 сутки регенеративные процессы в зоне дефекта были направлены на улучшение васкуляризации клеточных структур регенерата и увеличение количества фибробластов в подопытной группе по сравнению с группой контроля, в которой только происходит формирование пучков волокон. Под действием стромально-васкулярной фракции активнее протекает формирование и созревание грануляционной ткани. Фиброзная ткань замещает область дефекта вследствие действия суспензии (рис. 7).

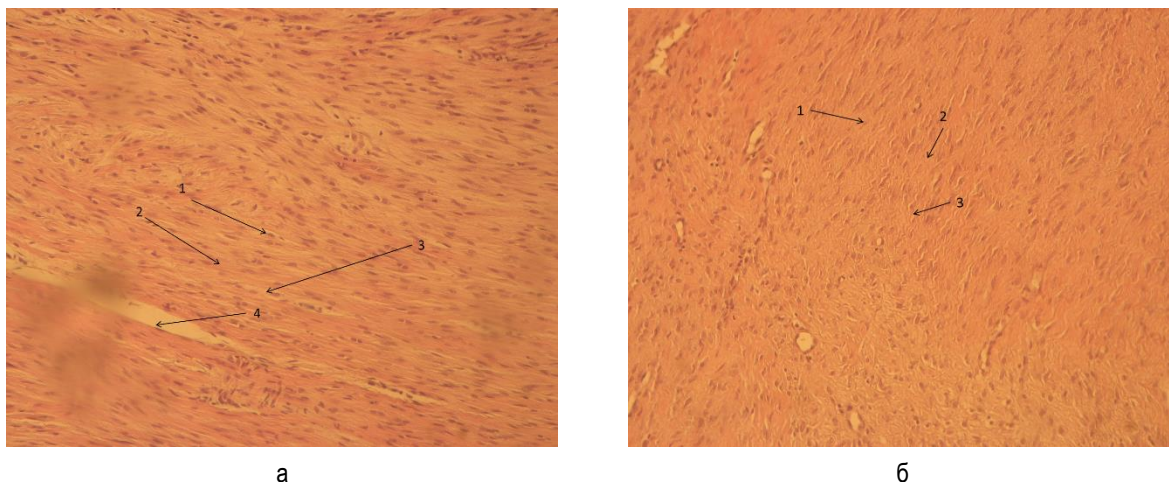


Рис. 7. Микроморфологическая характеристика. Структурная организация регенерата сухожилия на 30 сутки (гематоксилин и эозин, об. 20, ок. 10):
а – контроль; б – подопытная группа; 1 – теноциты; 2 – коллагеновые волокна; 3 – эндотений; 4 – перитений

Представленные данные свидетельствуют, что на финальном этапе эксперимента (60 суток) в подопытной группе, в сравнении с контрольной группой, произошло полное заживление дефекта сухожилия. Важнейшим критерием, отражающим полное восстановление травмированного сухожилия, является упорядоченность фиброархитектоники, взаимно параллельное расположение волокон и утолщение их пучков. Кроме того, подопытным образцам присуща большая, по сравнению с регенератом, образующемся при самопроизвольном заживлении, степень их васкуляризации. В контрольной группе, даже на 60 сутки наблюдения, вновь образованная соединительная ткань не имеет четкого структурного оформления, что может являться фактором риска возникновения рецидивов повреждения (микронадрывов ткани) (рис. 8).

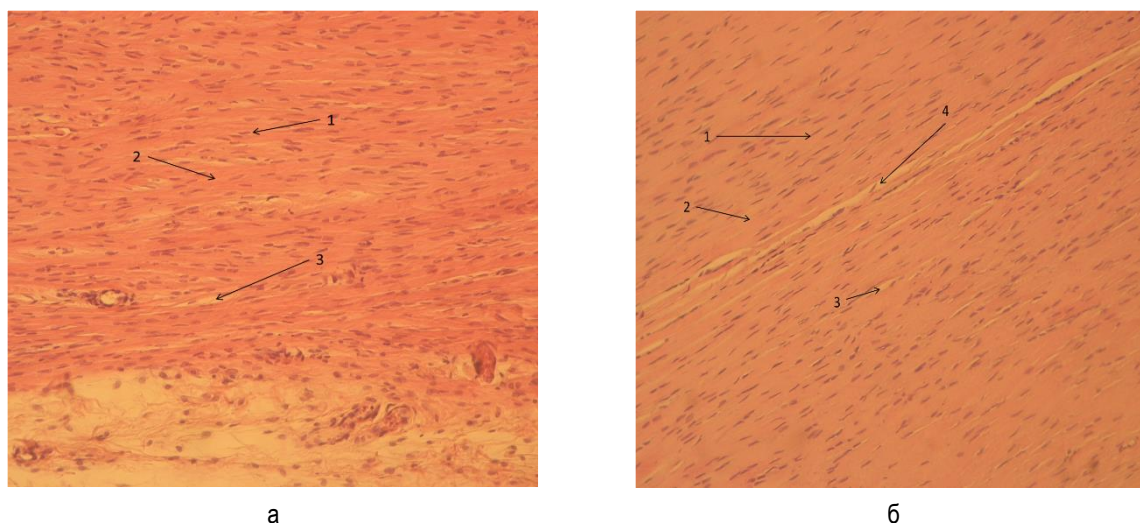


Рис. 8. Микроморфологическая характеристика регенерата сухожилия на 60 сутки (гематоксилин и эозин, об. 20, ок. 10):
а – контроль; б – подопытная группа; 1 – теноциты; 2 – коллагеновые волокна; 3 – эндотений; 4 – перитений

Заключение. На основании проведенных исследований установлено: 1) в структурном

оформлении ахиллова сухожилия крыс участвуют: пяточные ветви двуглавой и полусухожильной мышцы, латеральная и медиальная икроножные мышцы и поверхностный сгибатель пальцев; 2) у подопытных животных обнаружены микроморфологические преобразования соединительной ткани, направленные на упорядоченность фиброархитектоники и утолщение пучков коллагеновых волокон, в то время как у животных контрольной группы – нарушения упорядоченности волокон, что способствует возникновению рецидивов; 3) микроморфологические показатели свидетельствуют о положительном результате экспериментальной апробации применения аутологичной суспензии клеток СВФ при лечении животных с разрывом сухожилий.

Библиографический список

1. Деев, Р. В. Профессор Александр Александрович Максимов: эволюция идей // Гены & клетки. – 2014. – Т. IX, № 2. – С. 2-14.
2. Дыгай, А. М. Клеточная терапия: новые подходы / А. М. Дыгай, Г. Н. Зюзьков // Наука в России. – 2009. – Т. 169, №1. – С. 4-8.
3. Елисеев, В. Г. Атлас микроскопического и ультрамикроскопического строения клеток, тканей и органов / В. Г. Елисеев, Ю. И. Афанасьев, Е. Ф. Котовский, А. Н. Яцковский. – 5-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 2004. – С. 99-104.
4. Калиновский, А. А. Актуальные проблемы применения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в современной ветеринарной медицине // Ветеринария Кубани. – 2011. – № 3. – С. 28-31.
5. Лопатина, Т. В. Индукции нейральной дифференцировки стромальных клеток жировой ткани / Т. В. Лопатина, Н. И. Калинина, А. В. Ревещин [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. IV, №3. – С. 50-54.
6. Пальцев, М. А. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Т. 1. Что есть стволовая клетка? / М. А. Пальцев, В. В. Терских, А. В. Васильев. – М. : Медицина ; Шико, 2009. – С. 13-31.
7. Семченко В. В. Регенеративная биология и медицина. Книга I. Генные технологии и клонирование / В. В. Семченко, С. И. Еренев, С. С. Степанов [и др.]. – Омск-Москва-Томск : Омская областная типография, 2012. – 296 с.

References

1. Deev, R. V. (2014). Professor Aleksandr Aleksandrovich Maksimov: evoluciia idei [Professor Alexander Alexandrovich Maximov: the evolution of ideas]. *Geny & kletki – Genes & Cells*, IX, 2, 2-14 [in Russian].
2. Dygay A. M., & Zyuz'kov G. N. (2009). Kletochnaia terapiia: novii podhodi [Cell therapy: new approaches]. *Nauka v Rossii – Science in Russia*, 169, 1, 4-8 [in Russian].
3. Eliseev, V. G., Afanasyev, Yu. I., Kotovsky, E. F., & Yatskovsky, A. N. (2004). Atlas mikroskopicheskogo i ultra mikroskopicheskogo stroeniia kletok, tkanei i organov [Atlas of the microscopic and ultramicroscopic structure of cells, tissues and organs]. Moscow: Medicine [in Russian].
4. Kalinovsky, A. A. (2011). Aktualiniie problemi primeneniia mulitipotentnikh mezenhimalinikh stromalinikh kletok v sovremennoi veterinarnoi medicine [Actual problems of the use of multipotent mesenchymal stromal cells in modern veterinary medicine]. *Veterinariya Kubani – Veterinaria Kubani*, 3, 28-31 [in Russian].
5. Lopatina T. V., Kalinina N. I., & Revishchin A. V. et al. (2008). Indukcii neiralnoi differencirovkistromalinikh kletok zhirovoi tkani [Induction of the neural differentiation of stromal cells of adipose tissue]. *Kletochnaia transplantologija i tkanevaia inzheneriia – Cellular Transplantation and Tissue Engineering*, IV, 3, 50-54 [in Russian].
6. Paltsev M. A., Terskih V. V., & Vasiliev A. V. (2009). Biologija stvolovikh kletok i kletochnie tekhnologii. T. 1. Chto est stvolovaia kletka? [Stem cell biology and cell technology. T. 1. What is a stem cell]. Moscow: Medicine ;Shiko [in Russian].
7. Semchenko V. V., Ereniev S. I., & Stepanov S. S. et al. (2012). Regenerativnaia biologija i medicina. Kniga I. Gennie tekhnologii i klonirovanie [Regenerative biology and medicine. Book I. Gene Technology and Cloning]. Omsk-Moscow-Tomsk: Omsk Regional Printing House [in Russian].