

DOI

УДК 617.615.361.616

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ АХИЛЛОВА СУХОЖИЛИЯ В УСЛОВИЯХ АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА

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

109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, 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 им. К. И. Скрябина.

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

E-mail: am.zharikov@gmail.com

Ключевые слова: сухожилие, волокна, фракция, регенерация, васкуляризация, фиброциты.

Цель исследований – выявить особенности заживления ахиллова сухожилия в условиях аутоотрансплантации клеточного продукта, отражающие регенераторную активность стромально-васкулярной фракции. Современные регенеративные методы лечения животных с повреждениями сухожилий предполагают применение стромально-васкулярных клеток жировой ткани. Они представляют популяцию клеток, обладающих высокой степенью пластичности, пролиферативной активностью и способностью к секреции множества ангиогенных факторов. Однако отсутствуют данные о морфологических и морфометрических эквивалентах регенераторного процесса при их применении в условиях повреждения сухожильно-связочного аппарата. Представлены микроморфометрические показатели, обосновывающие эффективность применения аутологичного клеточного продукта при разрыве ахиллова сухожилия. Проведена оценка влияния стромально-васкулярной фракции из жировой ткани крыс на регенеративные процессы при заживлении индуцированного дефекта сухожильной ткани, выражающиеся в увеличении у подобных животных показателей толщины пучков первого и второго порядка в подопытной группе, достоверных различиях по сравнению с контролем клеток фибробластической популяции и количестве кровеносных капилляров. На основании данных о положительном влиянии исследуемого аутологичного клеточного продукта на регенерацию ахиллова сухожилия научно обоснована целесообразность его применения в ветеринарной медицине. Экспериментальная модель исследования – декоративная крыса (n=20). Материал исследований – ахиллово сухожилие. Использовали комплексный методический подход, включающий экспериментальное моделирование, микроморфологические исследования, микроморфометрию и статистическую обработку данных. Выявлено, что у подопытных животных, которым вводили стромально-васкулярную фракцию, обнаружены микроморфометрические преобразования соединительной ткани, направленные на утолщение пучков первого и второго порядков, переход фибробластов в структурированные и упорядоченные фиброциты (теноциты), ускорение коллагеногенеза и усиление васкуляризации.

FEATURES OF REPARATIVE REGENERATION OF ACHILLES TENDON IN THE CONDITIONS OF AUTOLOGOUS TRANSPLANTATION OF CELL POOL

N. A. Slesarenko, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department «Animal Anatomy and Histology named after Professor A. F. Klimov», FSBEI HE Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology K. I. Scryabin.

109472, Moscow, Academician Scryabin 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», FSBEI HE Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology K. I. Scryabin.

109472, Moscow, Academician Scryabin street, 23.

E-mail: am.zharikov@gmail.com

Keywords: tendon, fibers, fraction, regeneration, vascularization, fibrocytes.

The aim of the study is identification of features of Achilles tendon healing in the conditions of auto-transplantation of the cellular element, reflecting the regenerative activity of stromal-vascular fraction. Modern regenerative treatment methods for animal with tendon injuries involve stromal-vascular cells application of adipose tissue. They represent cell pool with high plasticity, proliferative activity, and ability to secrete multiple angiogenic factors. However, there is no data on morphological and morphometric regenerative equivalents of their use in case of tendon ligaments injury. Micro morphometrical indicators are presented that substantiate the effectiveness of using autologous cellular elements in case of Achilles tendon injury. The influence of stromal-vascular fraction from rat adipose tissue on regenerative process during healing of an induced tendon tissue defect was evaluated which lead to an increase in the thickness of bundles of the first and the second orders in the experimental group, significant differences in comparison with the control of the fibroblastic cell pool, and the number of blood capillaries of these animals. Based on the positive data of the autologous cell pool on the regenerative ability of the Achilles tendon, its practicability for veterinary medicine was scientifically justified. The experimental model of the study is a fancy rat (n=20). Achilles tendon was the research material. A complex methodological approach was used, including experimental modeling, micro morphological studies, micro morphometry, and statistical data processing. It was revealed that experimental animals injected with stromal-vascular fraction, micro morphometric transformations of connective tissue were detected, aimed at thickening of bundles of the first and second orders, the transition of fibroblasts to structured and ordered fibrocytes (tenocytes), acceleration of collagenogenesis and vascularization enhancement.

Изучение восстановительных потенций тканей опорно-двигательного аппарата и путей направленного воздействия на ускорение репаративных процессов – одна из фундаментальных проблем ветеринарной травматологии и ортопедии [6, 7].

Стремительное развитие науки в области регенеративной медицины и клеточной биологии, фундаментальные исследования и поиск перспективных терапевтических подходов в данном направлении обещают в ближайшем будущем новые открытия. Высокий интерес к технологиям применения различных стволовых клеток во многом определен их потенциалом в восстановлении поврежденных тканей и органов [1, 3].

Суть применения таких технологий заключается в стимуляции восстановления поврежденных сухожилий с помощью клеток, взятых из организма самого объекта. Аутологичные клетки не отторгаются организмом животного после введения, поскольку распознаются его защитными системами как собственные [2, 3].

Современные регенеративные методы лечения животных с повреждениями сухожилий предполагают применение стромально-васкулярных клеток жировой ткани. Известно, что они представляют популяцию клеток, обладающих высокой степенью пластичности, пролиферативной активностью и способностью к секреции множества ангиогенных факторов [4, 5, 7]. Вместе с тем, отсутствуют данные о морфологических и морфометрических эквивалентах регенераторного процесса при их применении в условиях повреждения сухожильно-связочного аппарата.

Цель исследований – выявить особенности заживления ахиллова сухожилия в условиях аутотрансплантации клеточного продукта, отражающие регенераторную активность стромально-васкулярной фракции.

Задачи исследований – установить сравнительные микроморфометрические показатели пучков коллагеновых волокон ткани сухожилия 1 и 2 порядка в области травмы у животных экспериментальных групп (интактная, контрольная и подопытная); представить микроморфометрические показатели фибробластической популяции в сравниваемых группах; охарактеризовать степень васкуляризации ткани регенерата в зоне повреждения.

Материал и методы исследования. Исследования выполнены на базе кафедры «Анатомия и гистология животных им. профессора А. Ф. Климова» ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА имени К. И. Скрябина на трех группах декоративных крыс разновидности «Стандарт» (интактная, контрольная и подопытная), подобранных по принципу аналогов.

Экспериментальные группы были сформированы из клинически здоровых животных с учетом происхождения, пола (самцы), возраста, живой массы.

Использовали комплексный методический подход, включающий экспериментальное моделирование с целью получения аутологичного клеточного продукта, анатомическое

препарирование, гистологическое исследование биоптатов ахиллова сухожилия, микроморфологические исследования, микроморфометрию и статистическую обработку данных. В контрольной группе область повреждения заживала самопроизвольно, в подопытной группе – под влиянием аутологичных клеток стромально-васкулярной фракции. Ахиллово сухожилие животных интактной группы использовали для определения нормативных микроморфометрических показателей.

Все манипуляции с лабораторными животными проводили согласно «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 18 марта 1986 г. ETS №123) после выдерживания их на двухнедельном карантине.

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

Микроморфометрию осуществляли с помощью программы «ImagScore». Оценку статистической значимости различий исследуемых показателей осуществляли с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследований. Как известно, ткань сухожилия относится к группе соединительных тканей, являясь плотной оформленной соединительной тканью. У крыс ее строение подчинено общим закономерностям, которые присущи животным других таксономических групп. Установлено, что функциональной единицей ткани является участок межклеточного вещества с сухожильными клетками, который окружен артериоло-венулярным анастомозом. Каждая функциональная единица характеризуется четкой цито-, фибро- и ангиоархитектоникой. Коллагеновые волокна окружены эндотеноном, вдоль которого располагаются цепочки клеток фибробластической популяции и сосуды капиллярного русла.

На основании данных сравнительного микроморфометрического анализа регенерата в исследуемых группах установлено, что на 7 сутки у особей контрольной группы пучки коллагеновых волокон первого порядка тонкие, не имеют строгой ориентационной упорядоченности и четких границ, в отличие от пучков первого порядка у крыс подопытной группы, которые по параметрам толщины коллагеновых конструкций опережали группу контроля. На 14 сутки наблюдений тенденция к увеличению толщины пучков сохранялась с преимуществом у подопытной группы. К 30 суткам эксперимента у крыс подопытной группы толщина пучков первого порядка существенно возростала по сравнению с предыдущим сроком наблюдений. Следует отметить, что сами волокна приобретают волнистую конфигурацию, свойственную морфологической организации сухожилия в норме. На заключительном сроке эксперимента выявлены достоверные различия в показателях толщины пучков первого порядка у животных сравниваемых групп. Более того, морфометрические показатели сухожильной ткани у животных подопытной группы на 60 сутки практически соответствовали параметрам нормы (параметрам интактной группы) (табл. 1).

Таблица 1

Микроморфометрические показатели пучков первого порядка ахиллова сухожилия крыс в контрольной, подопытной и интактной группах, мкм ($P \leq 0,05$)

Сроки эксперимента	Группа животных		
	I группа (контроль)	II группа (подопытная)	III группа (интактная)
7 сутки	3,34±0,79	3,78±0,92	8,35±1,02
14 сутки	3,55±0,79	4,86±0,45	
30 сутки	4,71±0,69	6,14±0,79	
60 сутки	4,76±0,50	6,42±0,67	

При изучении микроморфометрических показателей на 14 сутки эксперимента было установлено, что на данном сроке регенеративного процесса в ткани сухожилия формируются хорошо различимые пучки второго порядка. Представители подопытной группы достоверно опережают по их толщине своих контрольных аналогов. Этот процесс усиливается к 30 суткам эксперимента. На заключительном сроке эксперимента (60 сутки) показатель толщины волокон в подопытной группе становится равен 40,1±6,8 мкм, что соответствует состоянию сухожильной ткани в норме (показатель толщины составляет 43,0±4,85 мкм) (табл. 2).

Таблица 2

Микроморфометрические показатели пучков второго порядка ахиллова сухожилия крыс в контрольной, подопытной и интактной группах, мкм ($P \leq 0,05$)

Сроки эксперимента	Группа животных		
	I группа (контроль)	II группа (подопытная)	III группа (интактная)
14 сутки	17,6±2,37	23,2±3,41	43,0±4,85
30 сутки	25,3±6,94	30,2±3,58	
60 сутки	33,4±7,11	40,1±6,8	

При сравнительном анализе цитоархитектоники, и прежде всего клеток фибробластической популяции, выявлено, что на ранних сроках регенерации они многочисленны, так как способствуют формированию новой сухожильной ткани в зоне дефекта и тем самым активно задействованы в процессе коллагеногенеза. Вместе с тем, в подопытной группе обнаружено их достоверное, по сравнению с контролем, количественное уменьшение, в связи с приобретением фенотипа фиброцитов, что может отражать стадийность ремоделирования цитоархитектоники, которое начинается со стороны эндотенона (табл. 3).

Таблица 3

Количество фибробластов в зоне повреждения ахиллова сухожилия крыс в контрольной, подопытной и интактной группах, шт.

Сроки эксперимента	Группа животных		
	I группа (контроль)	II группа (подопытная)	III группа (интактная)
7 сутки	121	102	36
14 сутки	98	77	
30 сутки	74	61	
60 сутки	59	48	

Одним из важных критериев полноценной регенерации сухожильной ткани является степень ее васкуляризации. При микроморфометрических исследованиях кровеносного русла ткани регенерата существенных различий между показателями их количества в сравниваемых группах не обнаружено. Вместе с тем, на 30 сутки наблюдений у животных в подопытной группе насыщенность ткани сухожилия капиллярами превосходит таковую в контроле. Из этого следует, что стромально-васкулярная фракция существенное влияние на развитие капиллярной сети в области дефекта оказывает на 30 сутки эксперимента (табл. 4).

Таблица 4

Количество кровеносных капилляров в зоне повреждения ахиллова сухожилия крыс в контрольной, подопытной и интактной группах, шт.

Сроки эксперимента	Группа животных		
	I группа (контроль)	II группа (подопытная)	III группа (интактная)
7 сутки	3	5	6
14 сутки	5	6	
30 сутки	4	8	
60 сутки	4	6	

Заключение. Установлены особенности репаративной регенерации при индуцированном повреждении ахиллова сухожилия в условиях трансплантации аутологичного клеточного продукта – стромально-васкулярной фракции, выражающиеся в формировании в области повреждения органоспецифического регенерата и сокращений общих сроков заживления. Механизм ускоренной, в сравнении с контролем, регенерации травмированного сухожилия при ауто трансплантации тестируемого клеточного продукта связан со стимуляцией в области регенерата коллагено- и ангиогенеза, что коррелирует с установленными микроморфометрическими показателями. Установленные микроморфометрические показатели регенерата в области индуцированной травмы ахиллова сухожилия, направленные на стимуляцию и трофическое обеспечение регенераторного процесса, свидетельствуют о перспективности применения аутологичной стромально-васкулярной фракции в клинической практике при заживлении травм сухожилий у животных.

Библиографический список

1. Берсенева, А. В. Клеточная трансплантология – история, современное состояние и перспективы / А. В. Берсенева // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – №1. – С. 32-33.
2. Веремеев, А. В. Стромально-васкулярная фракция жировой ткани как альтернативный источник клеточного материала для регенеративной медицины / А. В. Веремеев, Р. Н. Болгарин, М. А. Петкова, Н. Кац, В. Г. Нестеренко // Гены & клетки. – 2016. – Т. XI, №1. – С. 35-42.
3. Деев, Р. В. Профессор Александр Александрович Максимов: эволюция идей / Р. В. Деев // Гены & клетки. – 2014. – Т. IX, № 2. – С. 2-14.
4. Иванов, А. В. Современные представления о механизмах репаративной регенерации ахиллова сухожилия после его разрыва / А. В. Иванов, Д. В. Козлов // Вестник Смоленской государственной медицинской академии – 2015. – №4 – С. 74-79.
5. Ярыгин, В. Н. Тканевые клеточные системы – основа биомедицинских клеточных технологий нового поколения: контуры идеологии / В. Н. Ярыгин // Вестник РАМН. – 2004. – №9. – С. 12-19.
6. Glazebrook, M. A. Histological Analysis of Achilles Tendons in an Overuse Rat Model / M. A. Glazebrook, J. R. Wright, Jr. M. Langman, D. W. Stanish, J. M. Lee // Journal of orthopaedic research. – 2008. – P. 840-846.
7. Smith, R. K. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy / R. K. Smith // Disabil Rehabil. – 2008. – №30. – P.1752-1758.

References

1. Bersenev, A. V. (2005). Kletochnaia transplantologija – istoriia, sovremennoe sostoianie I perspektivi [Cell Transplantology – History, Current State and Prospects]. *Kletochnaia transplantologiya I tkanevaia inzheneriia – Cell Transplantology and tissue engineering*, 1, 32-33 [in Russian].
2. Veremeev, A. V. Bolgarin R. N., Petkova M. A., Katz N., & Nesterenko V. G. (2016). Ctromalino-vaskuliarnaia frakciya zhirovoi tkani kak aliternativnii istochnik kletochnogo materiala dlia regenerativnoi medicine [Stromal-vascular fraction of adipose tissue as an alternative source of cellular material for regenerative medicine]. *Geny & kletki – Genes & Cells*, XI, 1, 35-42 [in Russian].
3. Deev, R. V. (2014). Professor Aleksandr Aleksandrovich Maksimov: evoliuciia idei [Professor Alexander A. Maksimov: evolution of ideas]. *Geny & kletki – Genes & Cells*, IX, 2, 2-14 [in Russian].
4. Ivanov, A. V., & Kozlov, D. V. (2015). Sovremennie predstavleniia o mekhanizmah reпаратivnoi regeneracii ahillova suhozhillia posle ego razriva [Modern ideas about the mechanisms of reparative regeneration of the Achilles tendon after its rupture]. *Vestnik Smolenskogosgudarstvennoj medicinskoj akademii – Bulletin of the Smolensk state medical Academy*, 4, 74-79 [in Russian].
5. Yarygin, V. N. (2004). Tkanevii kletochnii sistemi – osnova biomedicinskih kletocnih tekhnologii novogo pokoleniia: konturi Ideologii [Tissue cell systems-the basis of biomedical cell technologies of the new generation: contours of ideology]. *Vestnik RAMN – Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 9, 12-19 [in Russian].
6. Glazebrook, M. A., Wright, J. R., Langman, Jr. M., Stanish, D. W., & Lee, J. M. (2008). Histological Analysis of Achilles Tendons in an Over use. Rat Model. *Journal of orthopaedic research*, 840-846.
7. Smith, R. K. (2008). Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disabil Rehabil*, 30, 1752-1758.