

УДК 612.419.014.3.462.5:616.75



Волкова Н. О., Юхта М. С., Блонський Р. І., Коструб О. О., Гольцев А. М.

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна  
"ДУ "Інститут травматології та ортопедії" НАМН України, Київ, Україна*

e-mail: volkovanatali2006@yandex.ua

# КРІОКОНСЕРВОВАНІ АУТОЛОГІЧНІ МУЛЬТИПОТЕНТНІ МЕЗЕНХІМАЛЬНІ СТРОМАЛЬНІ КЛІТИНИ В ТЕРАПІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТЕНДОПАТІЇ

## РЕЗЮМЕ

На сьогоднішній день застосування стовбурових клітин є одним із перспективних шляхів лікування патології опорно-рухового апарату.

На моделі дегенеративно-дистрофічного ушкодження Ахіллових сухожиль у щурів ( $n = 60$ ) досліджено ефективність локального та системного введення кріоконсервованих аутологічних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (КрАММСК) кісткового мозку. Визначали морфологічну структуру тканин, вміст колагену I типу, наявність мічених РКН-26 клітин та проводили біомеханічні дослідження на 7-у, 21-у та 45-у добу після трансплантації.

Показано, що КрАММСК сприяють активізації регенеративних процесів у ушкоджених сухожиллях, що мало прояв у відновленні гістоструктури, міцності та вмісту колагену I типу. Локальний метод введення призводив до більш вираженого відновлення сухожиль у порівнянні з системним. За допомогою люмінесцентної мітки РКН-26 підтверджено присутність в зоні дефекту введених клітин протягом 21 доби.

Отримані результати можуть бути використані для обґрунтування та розробки методик лікування дегенеративно-дистрофічних уражень сухожиль у клінічній практиці.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** кріоконсервовані клітини, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, клітинна терапія, тендопатія.

Дегенеративні ушкодження сухожиль зустрічаються досить часто серед патології опорно-рухового апарату, як у людей взагалі, так і у спортсменів, зокрема. Аналіз даних сучасної літератури свідчить, що майже 67% ушкоджень сухожиль пов'язані з перевантаженням; 24,5% – з гострою травмою і тільки у 8,5% причиною були інші чинники. Несвоєчасна діагностика, продовження навантаження та неадекватні методи лікування хворих (особливо спортсменів) із синдромом хронічного перевантаження сухожиль (тендінопатіями) – призводять до порушення компенсаторних механізмів, що у свою чергу, спричиняє розвиток дегенеративно-дистрофічного ушкодження тканини сухожилля та є причиною часткової або повної втрати працездатності пацієнтів [3, 12, 17].

Тактика лікування хворих з дегенеративним ушкодженням сухожиль на сьогоднішній день не має чіткого патогенетичного обґрунтованого алгоритму лікування і характеризується неузгодженістю застосування різних методів лікування та їх низькою ефективністю, що пояснюється нездатністю задіяних методів відновити на достатньому рівні метаболічні та репаративні процеси у тканині дегенеративно зміненого сухожилля [6, 7, 15, 23, 27]. Труднощі терапії

тендінопатій пов'язані з малим вмістом клітинних елементів (фібробластів та тендіоцитів) в тканині взагалі та в дегенеративно-зміненому сухожиллі зокрема. На сьогоднішній день одним із перспективних шляхів є залучення до медичної практики досягнень молекулярної та клітинної біології, а саме застосування кріоконсервованих аутологічних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (КрАММСК) кісткового мозку. На відміну від інших методів, клітинна терапія передбачає введення живих, здатних до функціонування в організмі реципієнта клітин, які забезпечують заміщення або відновлення власних ушкоджених та/або недостатніх клітинних елементів.

Як відомо, ММСК кісткового мозку є мультипотентними клітинами, що здатні до диференціювання в широкий спектр клітин, включаючи фібробласти і теноцити [8, 9, 11]. Сучасні технології культивування та кріоконсервування дозволяють отримати запас аутологічних стовбурових клітин з наступним тривалим зберіганням при низьких температурах без суттєвих змін морфофункціонального стану, що дозволяє розморожувати їх безпосередньо перед терапевтичним застосуванням [16].

При лікуванні патологій опорно-рухового апарату у більшості випадків використовують метод введення клітин *in situ* (локально) [10, 14, 24, 25, 28, 32]. Існуючі експериментальні дані по внутрішньовенному введенню ММСК в організм інтактної тварини свідчать про імуномодулюючу дію та дифузний розподіл донорського матеріалу, в першу чергу по тканинах мезодермального походження [18, 21, 22]. В раніше проведених нами дослідженнях показано, що локальне введення культивованих ММСК зупиняє прогресування дегенеративних змін та сприяє відновленню ушкодженої структури сухожилля [2, 5]. Для оцінки впливу трансплантованого клітинного матеріалу на відновлення ушкодженої тканини або органа застосовують гістологічні, біохімічні, біофізичні, імунологічні методи, але не завжди проводиться дослідження місцезнаходження введених клітин. Таким чином, цікавим напрямком є проведення порівняльної оцінки здатності до хоумінгу та стимуляції регенеративних процесів кріоконсервованих ММСК. Ці дослідження дозволять оцінити термін збереження клітин в тканині, що відновлюється, та репаративний потенціал самих клітин. Тому актуальним є проведення порівняльного дослідження оцінки лікувального ефекту КрАММСК кісткового мозку за умов локального та системного введення.

Мета роботи – дослідити вплив кріоконсервованих аутологічних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку на регенерацію дегенеративно-дистрофічно ушкоджених сухожилля при системному та локальному введенні.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження виконано на 60 статевозрілих щурах-самцях масою  $250 \pm 30$  г. У роботі використовували аутологічні ММСК, які отримували з резектованого фрагмента клубової кістки щурів. Клітини виділяли шляхом вимивання за допомогою розчину Хенксу (PAA, Австрія) з наступним пропусканням крізь голки з діаметром, що поступово зменшувався. Наступний етап включав центрифугування при 1500 об/хв (834 g) протягом 5 хв. Отриману суспензію клітин ресуспендували в живильному середовищі і висівали на культивальні флакони. При культивуванні щільність посіву клітин становила  $10^3$  клітин/см<sup>2</sup> культивального флакону площею 25 см<sup>2</sup> (PAA, Австрія). Живильне середовище культивування містило: середовище IMDM (PAA, Австрія), 10% ембріональної сироватки (ЕС) великої рогатої худоби (*HyClone*, США), 150 мкг/мл гентаміцину (*Фармак*, Україна) та 10 мкг/мл амфотерицину Б (PAA, Австрія). Живильне середовище змінювали кожні 3 доби. У роботі були використані стандартні умови культивування при 37 °C в атмосфері 5% CO<sub>2</sub> з використанням інкубатора (*Sanyo*, Японія). По досягненню моношару культури клітин пасажували [1].

Кріоконсервування здійснювали під захистом 10% ДМСО (*ПанЕко*, Росія) з додаванням 20% ЕС (PAA, Австрія) на середовищі IMDM (PAA, Австрія). Отриману суспензію вміщували по 1 мл у кріопробірки *Nunc*. Швидкість охолодження складала 1 °C/хв до -80 °C з наступним зануренням у рідкий азот. Відігрів здійснювали на водяній бані при 40 °C до появи рідкої фази. Видалення кріопротектора проводили шляхом повільного додавання 1:9 розчину Хенкса (PAA, Австрія) з наступним центрифугуванням при 1500 об/хв (834 g) протягом 5 хв. Життєздатність ММСК оцінювали по виключенню суправітального барвника трипанового синього (*Sigma-Aldrich*, США) – експрес-тесту на цілісність мембрани клітин після кріоконсервування.

Моделювання дегенеративно-дистрофічних ушкоджень Ахіллових сухожилля проводили шляхом ін'єкційного введення 0,03 мл розчину «*Дипроспан*» кожну 7-у добу протягом 4 тижнів [4]. На 28-у добу тваринами вводили: контрольна група (n = 20) – фізіологічний розчин в об'ємі 0,025 мл; дослідна група 1 (n = 15) – локальне введення КрАММСК в дозі  $0,25 \cdot 10^6$  клітин, дослідна група 2 (n = 15) – системне введення КрАММСК в дозі  $0,25 \cdot 10^6$  клітин, дослідна група 3 (n = 5) – локальне введення КрАММСК, мічених PKH-26, в дозі

$0,25 \cdot 10^6$  клітин; дослідна група 4 (n = 5) – системне введення КрАММСК кісткового мозку, мічених PKH-26, в дозі  $0,5 \cdot 10^6$  клітин. При локальному введенні суспензію клітин вводили в обидва Ахіллові сухожилля дослідних тварин з тендопатією, відступивши на 0,25 см від п'яtkового горба. Системне введення проводили шляхом ін'єкції КрАММСК у хвостову вену дослідних тварин. Фарбування клітин PKH-26 (*Sigma-Aldrich*, США) проводили згідно інструкції фірми-виробника.

Після проведення терапії по 5 тварин контрольної та дослідних груп 1 і 2 виводили з експерименту на 7-у, 21-у та 45-у добу. Тварин дослідних груп 3 і 4 та групи контролю виводили з експерименту на 21-у добу (n = 5). Для гістологічного, імунофлуоресцентного та біомеханічного дослідження висікали Ахіллові сухожилля разом з місцем кріплення до бугра п'яtkової кістки.

Отримані зразки Ахіллових сухожилля для гістологічного дослідження фіксували в 10%-ному розчині формаліну та після зневоднення й знежирювання в розчинах ацетону та етанолу наростаючої концентрації заливали в целоїдин. Отримували гістологічні зрізи в сагітальній площині, які забарвлювали гематоксином та еозином.

Оцінку вмісту колагену I типу та детекцію мічених PKH-26 клітин проводили на кріостатних зрізах Ахіллових сухожилля завтовшки 7 мкм. Забарвлення на колаген I типу проводили з використанням моноклональних антитіл до колагену I типу COL-1, титр 1:2000 (*Sigma-Aldrich*, США) та CF<sup>TM</sup>488A (*Sigma-Aldrich*, США) згідно інструкції фірми-виробника. Люмінесцентну мікроскопію препаратів зразків Ахіллових сухожилля проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопа (*МИКМЕД-2*, Росія). За наявності аутолюмінесценції проводили її гасіння 0,3 M розчином гліцину (PAA, Австрія) протягом 20 хвилин з наступною повторною мікроскопією препаратів. В досліді по детекції мічених PKH-26 клітин кріостатні зрізи додатково були забарвлені 1 мкг/мл DAPI (*Sigma-Aldrich*, США) з метою візуалізації ядер клітин. Результати фіксували фотографуванням.

Руйнуюче навантаження при натягу – F (МПа) визначали за формулою:  $F = N / S$ , де N – прикладене навантаження до виникнення розриву сухожилля; S – площа перерізу сухожилля ( $S = \pi \cdot a \cdot b$ , де  $\pi = 3,14$ ; a – висота; b – ширина) [5].

Усі маніпуляції з тваринами здійснювали відповідно до вимог біоетики та міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, а також «Загальними принципами експериментів на тваринах», схваленими II Національним конгресом з біоетики (Київ, 2004 р.).

При статистичній обробці результатів використовували однофакторний дисперсійний аналіз і t-критерій Стьюдента з використанням програм *MS Excel* і *Statistica 8*.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі роботи була проведена оцінка цілісності мембрани ММСК після кріоконсервування. Життєздатність КрАММСК складала  $78,5 \pm 6,2\%$  що в 1,2 разу нижче ( $p \leq 0,05$ ), ніж в нативних культурах ( $95,2 \pm 3,5\%$ ).

Аналіз даних гістологічного та імунофлуоресцентного досліджень Ахіллових сухожилля тварин контрольної групи показав, що на 7-у добу терапії в досліджених препаратах виявляли погіршення тинкторіальних властивостей сухожильної тканини, що проявлялося у послабленні фарбування сухожильних волокон та клітинних елементів – тендиноцитів. Відмічали дезорганізацію, хвилястість та погіршення тинкторіальних властивостей сухожильних волокон з візуалізацією невеликих за розміром та щільністю ділянок колагену I типу (рис. 1А, Г).

В усіх дослідних групах із застосуванням КрАММСК на 7-у добу явища хвилястості і дезорганізації у ділянках дегенеративно-дистрофічного процесу зберігалися. У тварин з локальною терапією

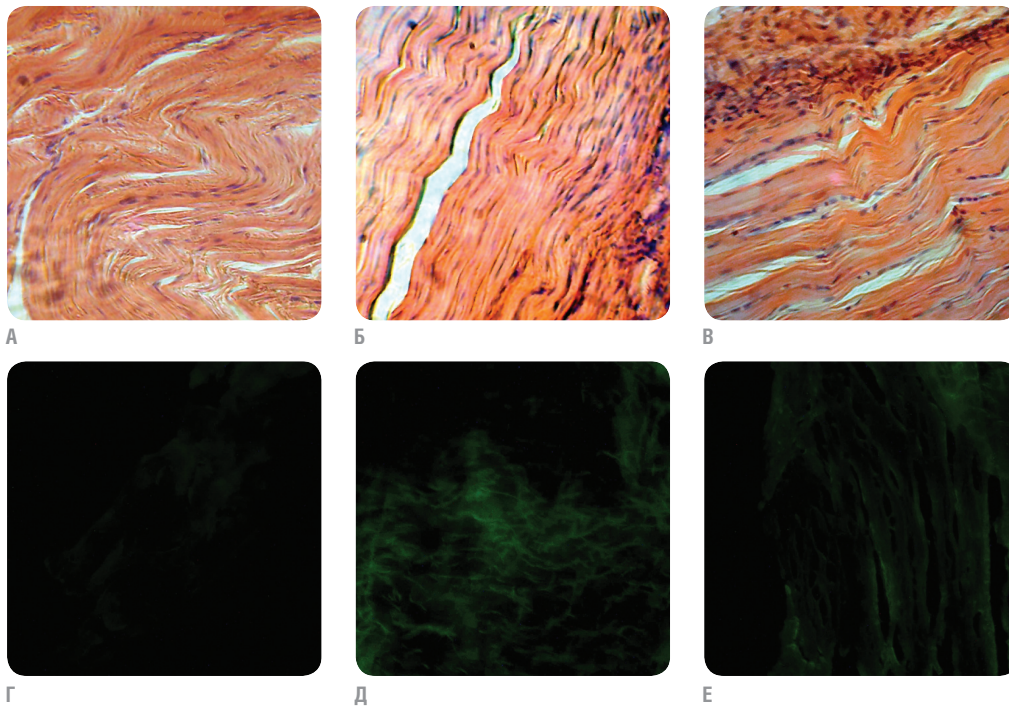


Рис. 1. Мікрофотографії ділянок сухожиль щурів контрольної (А, Г) та дослідних груп: локальне (Б, Д) та системне (В, Е) введення КрАММСК, 7-а доба спостереження. А-В – світлова мікроскопія, забарвлення гематоксилином та еозином, 200х; Г-Е – люмінесцентна мікроскопія, імуногістохімічне забарвлення криостатних зрізів сухожиль на колаген І типу, 150х.

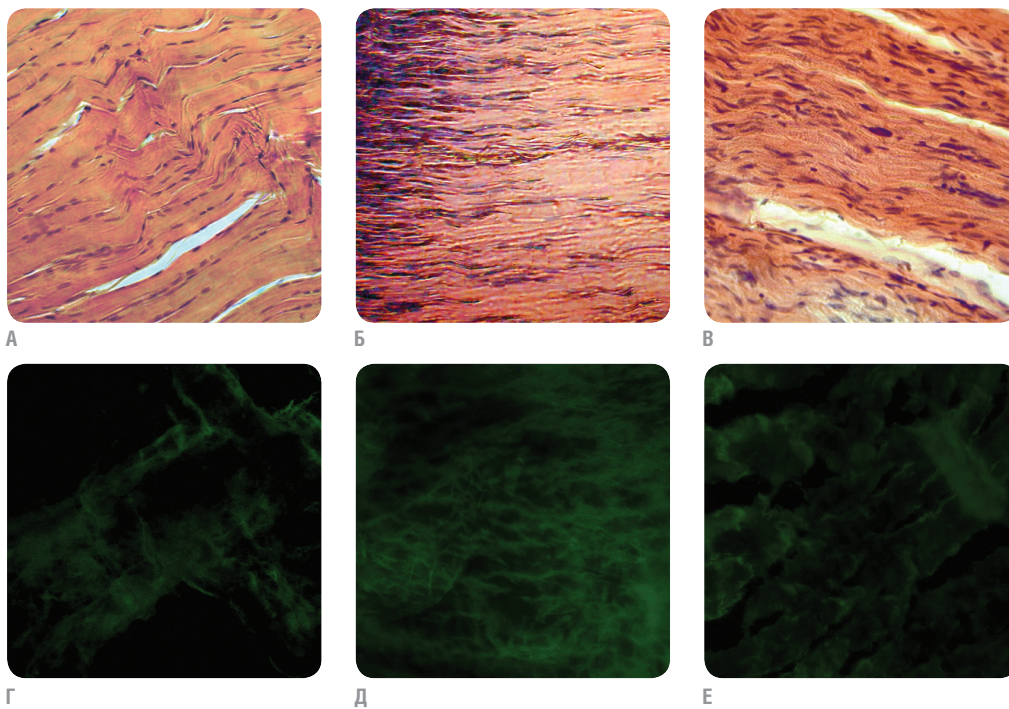


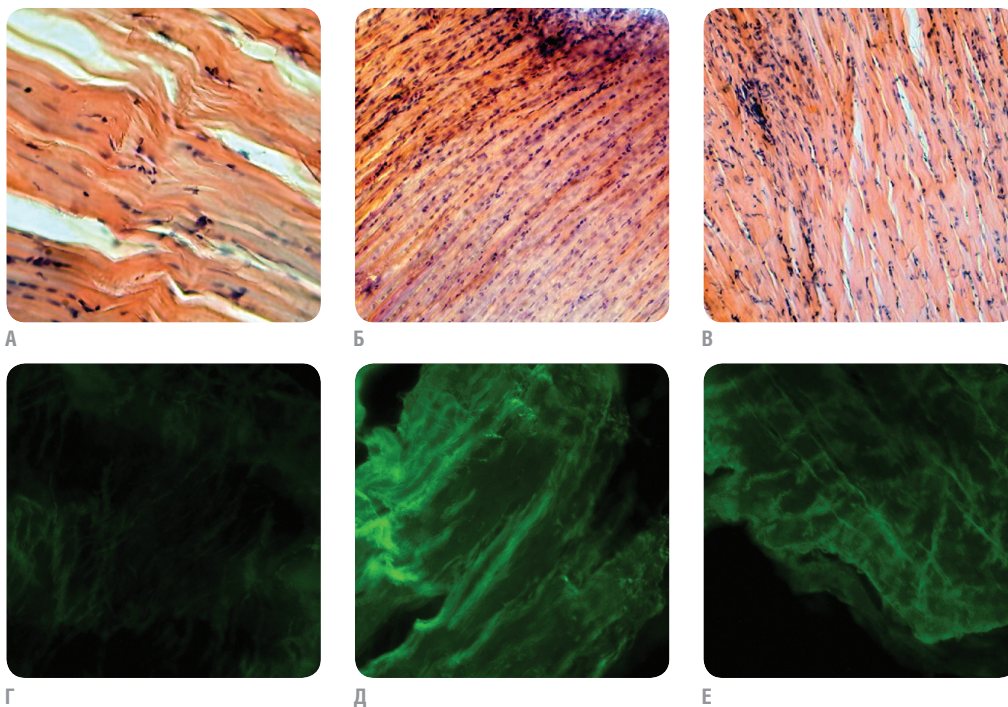
Рис. 2. Мікрофотографії ділянок сухожиль щурів контрольної (А, Г) та дослідних груп: локальне (Б, Д) та системне (В, Е) введення КрАММСК, 21-а доба спостереження. А-В – світлова мікроскопія, забарвлення гематоксилином та еозином, 200х; Г-Е – люмінесцентна мікроскопія, імуногістохімічне забарвлення криостатних зрізів сухожиль на колаген І типу, 150х.

на 7-у добу на фоні розвитку патологічного процесу у сухожиллі, що виник внаслідок попереднього введення «Дипроспану», відмічали значне збільшення кількості клітинних елементів у зоні дегенеративно-дистрофічного процесу та посилення базofilного забарвлення, що є характерним для активного диференціювання клітин (рис. 1Б). Сухожилльні волокна мали велику кількість ділянок з інтенсивним забарвленням до колагену І типу, які охоплювали більшу частину препарату (рис. 1Д). У тварин з системним введенням КрАММСК виявляли осередки накопичення клітинних елементів у паратеноні та частково у зоні дегенеративно-дистрофічного процесу, люмінесценція волокон до колагену І типу була не інтенсивною та охоплювала обмежені ділянки препарату (рис. 1В, Е). Усі вищеперераховані зміни характерні для

інтенсифікації процесів диференціювання клітинних елементів та їх проліферативної активності в осередку патологічного процесу.

На 21-у добу дослідження у тварин контрольної групи в сухожиллях відмічали наростання патологічних змін, що виражалось в збереженні явищ дезорганізації сухожилльних волокон та їх нерівномірному забарвленні (рис. 2А). Ділянки світіння колагену були не інтенсивними та мали дезорганізоване розташування (рис. 2Г). Отримані дані свідчать про прогресування дегенеративно-дистрофічних змін у сухожиллях на 21-у добу терапії, порівняно до попереднього строку спостереження.

Інша гістологічна картина спостерігалась у тварин з локальним введенням КрАММСК. На 21-у добу спостереження було виявлено



**Рис. 3.** Мікрофотографії ділянок сухожиль щурів контрольної (А, Г) та дослідних груп: локальне (Б, Д) та системне (В, Е) введення КрАММСК, 45-а доба спостереження. А-В – світлова мікроскопія, забарвлення гематоксилином та еозином, 200х; Г-Е – люмінесцентна мікроскопія, імуногістохімічне забарвлення кристатних зрізів сухожиль на колаген І типу, 150х.

прогресуюче збільшення кількості та інтенсивності фарбування клітинних елементів в осередку патологічного процесу. В розташуванні сухожильних волокон спостерігалось поліпшення чіткості контурів, зменшення хвилястості, рівномірне розташування ділянок колагену з інтенсивним світінням (рис. 2Б, Д). В сухожиллях тварин за умов системного введення КрАММСК на цьому ж строку відмічали накопичення клітинних елементів в деяких ділянках зони ушкодження та зменшення хвилястості і дезорганізації сухожильних волокон, які мали нерівномірне, мало інтенсивне забарвлення до колагену І типу в центрі препаратів Ахіллових сухожиль (рис. 2В, Е).

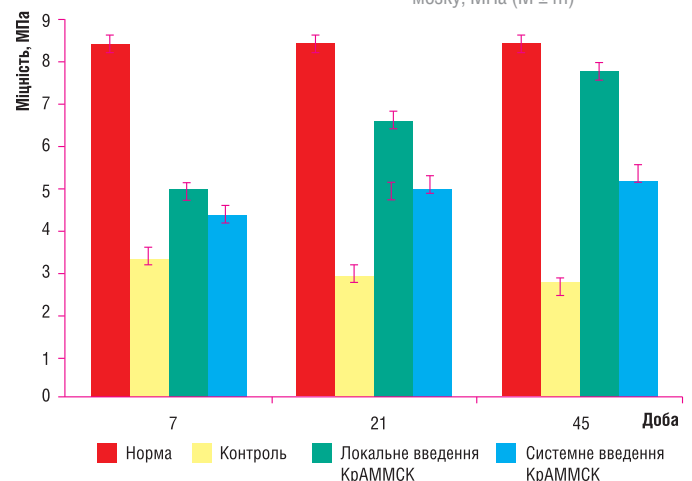
За 45 діб в Ахіллових сухожиллях тварин контрольної групи спостерігали більш виражені порушення тинкторіальних якостей і дезорганізації сухожильних волокон, кількість волокон з ділянками колагену І типу була зменшена у порівнянні з попередніми строками спостереження (рис. 3А, Г).

В сухожиллях тварин за умов локального введення КрАММСК відбувалася нормалізація процесів проліферації та інтенсивності фарбування клітинних елементів і сухожильних волокон, що свідчило про виражені процеси регенерації зони дегенеративно-дистрофічного процесу (рис. 3Б). Сухожильні волокна в місці ураження мали впорядковане розташування з рівномірним, чітким світінням колагену І типу (рис. 3Д).

Менш інтенсивні процеси відновлення спостерігали в сухожиллях тварин з системним введенням КрАММСК: покращення чіткості контурів сухожильних волокон, зменшення хвилястості, наявність клітинних елементів в деяких ділянках зони відновлення дегенеративно-дистрофічного ураження Ахіллових сухожиль, збільшення кількості ділянок колагену та інтенсивності їх світіння (рис. 3В, Е). Усі вищеписані зміни свідчили про перебіг повільних відновлювальних процесів у зоні дегенеративно-дистрофічного ураження сухожилля у порівнянні з локальним введенням на цьому ж строку спостереження.

Для об'єктивізації виявлених якісних змін додатково було проведено дослідження міцності сухожиль за умов введення КрАММСК. Останнє проводили шляхом визначення руйнуючого навантаження при натягу в динаміці. Отримані дані (рис. 4) за загальною тенденцією відповідали наведеним вище результатам, що були отримані за допомогою гістологічного та імунофлуоресцентного методів.

**Рис. 4.** Міцність дегенеративно-дистрофічно змінених сухожиль на розтягування у тварин з терапією КрАММСК кісткового мозку, МПа (М ± m)



Так, у тварин контрольної групи міцність сухожилків зменшувалася та була вірогідно нижчою ( $p \leq 0,05$ ), ніж у інтактних тварин у всі строки спостереження. Міцність сухожиль за умов терапії КрАММСК на всіх досліджених строках вірогідно ( $p \leq 0,05$ ) перевищувала відповідні показники в контрольній групі. За умов локального введення КрАММСК досліджуваний показник зростав в 1,5 разу на 7-у добу, в 2,3 разу – на 21-у, в 2,7 разу – на 45-у порівняно з контролем. Застосування КрАММСК за умов системного введення призводило до збільшення міцності на 7-у добу в 1,3 разу, на 21-у – в 1,7 разу, на 45-у – в 1,9 разу порівняно з відповідними показниками у контрольній групі тварин.

З метою визначення розподілу клітин при трансплантації в організмі реципієнта в клітини вводять наночастки, люмінесцентні барвники, генетично вбудовані люмінесцентні зонди та інші агенти, які сприяють встановленню місцезнаходження введених клітин. Для цього дослідження нами був обраний зонд РКН-26, який зв'язується з мембраною клітин. Флуоресценція цього барвника не переходить від клітини до клітини, але має здатність до переходу у дочірні клітини при мітозі. На рис. 5А наведено мікрофотографії культури ММСК кісткового мозку, мічених барвником РКН-26.

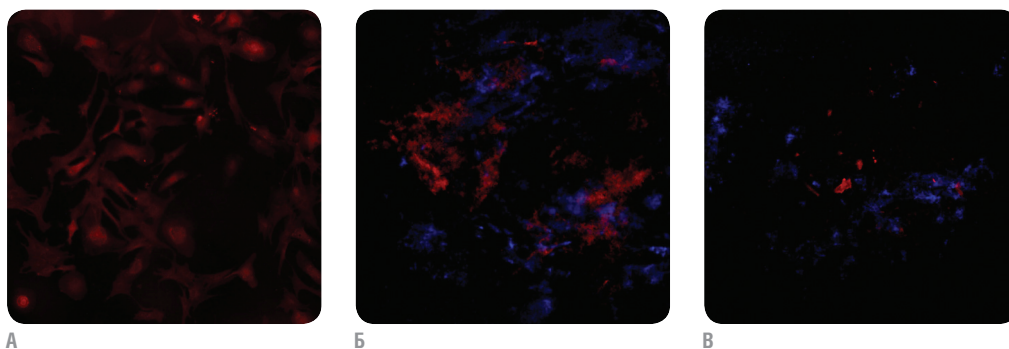


Рис. 5. Мікрофотографії КрАММСК, забарвлення РКН-26; 200х (А). Ділянки сухожилля щурів з локальним (Б) та системним (В) введенням КрАММСК, мічених РКН-26 (червоне світіння), ядра забарвлені DAPI (блакитне світіння); 21-а доба спостереження, люмінесцентна мікроскопія, 100х.

Люмінесцентна мікроскопія кріостатних зрізів зразків Ахіллових сухожилля тварин з локальним введенням мічених КрАММСК на 21-у добу показала наявність світіння в червоному діапазоні спектра (рис. 5Б). Люмінесцентне світіння було яскравим, чітким і локалізувалося по центру та краях досліджуваних препаратів. Мічені клітини розташовувалися щільними конгломератами між сухожилльними волокнами. При мікроскопічному дослідженні кріостатних зрізів Ахіллових сухожилля тварин з системним введенням мічених КрАММСК на 21-у добу спостерігалася наявність люмінесцентного світіння в червоній області (рис. 5В). Світіння мало вигляд невеликих за розміром конгломератів, які розташовувалися по центру досліджених препаратів. Слід зазначити, що кількість об'єктів, які мали люмінесценцію в червоній області спектра, була вище у випадку локального введення, ніж при системному.

Таким чином, проведені гістологічні, імунофлуоресцентні та біомеханічні дослідження свідчили, що у тварин контрольної групи протягом усього строку спостереження відбувався розвиток дегенеративно-дистрофічного процесу, що проявлялось у наростанні хвилястості та дезорганізації сухожилльних волокон, поширенні безклітинних зон, послабленні фарбування сухожилльних волокон та тендиноцитів, втраті чіткості контурів сухожилльних волокон, зниженні вмісту колагену I типу та показника міцності. При цьому введення КрАММСК в товщу дегенеративно-дистрофічно зміненого Ахіллового сухожилля сприяє нормалізації структурно-функціональної організації, вмісту колагену I типу, має тенденцію до повного відновлення міцності. Менш виражені процеси регенерації в Ахіллових сухожиллях відбувались за умов системного введення КрАММСК у порівнянні з локальним методом. Наведена різниця між контрольною та дослідними групами свідчить про здатність КрАММСК впливати на інтенсивність процесів регенераторного відновлення дегенеративно-дистрофічно уражених сухожилля, що підтверджується експериментами по детекції мічених клітин.

Отже, проведені дослідження свідчать, що локальне введення КрАММСК впливає на інтенсивність диференціювання клітинних елементів в зоні дегенеративно-дистрофічного процесу. Слід зазначити, що зміни, які відбувалися в тканині Ахіллових сухожилля за умов системного введення КрАММСК, охоплювали обмежені ділянки дегенеративно-дистрофічного процесу та мали менш виражений регенераторний ефект. Отримані результати можливо пов'язані як з відносно слабким кровопостачанням в сухожиллях, так і з часом, потрібним для міграції клітин в зону ураження [18]. Наведена різниця між контрольною та дослідними групами свідчить про ефективність застосування КрАММСК, що виражалось у відновленні гістологічної структури uszkodженої тканини, тенденцією до нормалізації вмісту колагену та міцності. Таким чином, у представленій роботі показано принципову можливість застосування КрАММСК для відновлення дегенеративно-дистрофічно змінених сухожилля у експериментальних тварин.

На сьогодні відомо, що ММСК як клітинам з високим рівнем експресії CXCR4-рецептора до SDF-1 (stromal cell derived factor) властива тропність до зон тканинного uszkodження, де збільшується

вміст SDF-1 [13]. Отримані в роботі результати свідчать, що ММСК, введені в хвостову вену, виявляються в Ахіллових сухожиллях на 21-у добу після терапії. Ці дані підтверджують гіпотезу про те, що ММСК не тільки пасивно розносяться по організму з кровотоком, а здійснюють спрямовану міграцію в області uszkodження тканини. Корируючий вплив системного введення ММСК кісткового мозку на перебіг дегенеративно-дистрофічного процесу в Ахіллових сухожиллях, можливо, пов'язаний з імуномодуючими властивостями ММСК. За даними авторів [20, 31] для активації імуносупресивної функції ММСК в організмі відбувається запуск механізмів дії IFN-γ окремо, або разом з TNFα, IL-1α та IL-1β. Отримані результати регенеративного впливу КрАММСК на перебіг процесу відновлення Ахіллових сухожилля дозволяють зробити висновок про можливість застосування в терапії тендопатій дослідженої культури клітин як за умов локального, так і системного введення. Ці дані узгоджуються з отриманими результатами по застосуванню нативних ММСК [19, 26, 28, 29, 30], що дозволяє рекомендувати створення кріобанків аутологічних клітин.

Завдяки homing-процесу, існування якого доведено в багатьох експериментальних роботах, відбувається міграція клітин до uszkodжених ділянок органів та зон ішемії [18], що забезпечує реалізацію ефектів клітинної терапії на рівні органів. Надзвичайно важливим є те, що методика внутрішньовенного введення – безпечна і неінвазивна процедура. Виходячи з цього положення, системне введення ММСК може знайти застосування при терапії розглянутої патології. Однак залишається відкритим питання про більш віддалені ефекти клітинної терапії, зокрема, тривалість пригнічення дегенеративно-дистрофічного процесу та можливої необхідності повторного застосування клітин.

## ВИСНОВКИ

1. ЛОКАЛЬНЕ ТА СИСТЕМНЕ ВВЕДЕННЯ КрАММСК КІСТКОВОГО МОЗКУ ТВАРИНАМ З ТЕНДОПАТІЄЮ ПРИЗВОДИТЬ ДО АКТИВІЗАЦІЇ РЕПАРАТИВНО-РЕГЕНЕРАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ В УШКОДЖЕНИХ СУХОЖИЛЛЯХ.
2. МІЦНІСТЬ ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФІЧНО УШКОДЖЕНИХ СУХОЖИЛЬ У ТВАРИН ПІСЛЯ ТЕРАПІЇ КрАММСК МАЄ ПОЗИТИВНУ ДИНАМІКУ ВІДНОВЛЕННЯ.
3. ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ АНАЛІЗ СВДЧИТЬ, ЩО ЗАСТОСУВАННЯ КрАММСК ПРИШВИДШУЄ СИНТЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ В ТКАНИНІ СУХОЖИЛКУ ТА НА 45-Й ДЕНЬ ПІСЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ПРИЗВОДИТЬ ДО ВІДНОВЛЕННЯ ВМІСТУ КОЛАГЕНУ I ТИПУ.
4. ЗА ДОПОМОГОЮ ЛЮМІНЕСЦЕНТНОЇ МІТКИ ПІДТВЕРДЖЕНО ПРИСУТНІСТЬ В ЗОНІ ДЕФЕКТУ ВВЕДЕНИХ КрАММСК ПРОТЯГОМ 21 ДОБИ.
5. ОТРИМАНІ РЕЗУЛЬТАТИ МОЖУТЬ БУТИ ВИКОРИСТАНІ ДЛЯ ОБГРУНТУВАННЯ ТА РОЗРОБКИ МЕТОДИК ЛІКУВАННЯ ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФІЧНИХ УРАЖЕНЬ СУХОЖИЛЬ У КЛІНІЧНІЙ ПРАКТИЦІ.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков [Текст] / Р. Адамс. – Москва: Мир, 1983. – 264 с.
2. Клітинні культури стромального походження в терапії експериментальної тендопатії [Текст] / *Н.О. Волкова, О.О. Коструб, Р.І. Блонський, та ін.* // Ортопедія, травматологія та протезування. – 2012. – №4. – С.40-44.
3. Долгова И. В. Ультразвуковая ангиография при повреждениях ахиллова сухожилия [Текст] / *И. В. Долгова* // Матер. III съезда Рос. ассоциации специалистов ультразвуковой диагностики в медицине. – Москва, 1999. – 201 с.
4. Модель дегенеративно-дистрофічного ураження сухожилля (експериментальне дослідження) [Текст] / *О.О. Коструб, А.Т. Бруско, Р.І. Блонський, та ін.* // Вісн. ортопед., травматол. та протезув. – 2009. – № 3. – С. 26–28.
5. Міцність сухожилля на розтягування після клітинної терапії його дегенеративного пошкодження в експерименті [Текст] / *О.О. Коструб, Р.І. Блонський, І.А. Лазарев, та ін.* // Вісн. ортопед., травматол. та протезув. – 2011. – № 3. – С. 23–26.
6. Восстановление структуры сухожилий с применением биоматериалов Аллоплант [Текст] / *Э.П. Мулдашев, Р.Т. Нигматуллин, В.Г. Гафаров, и др.* // Регенеративная хирургия. – № 1. – 2005. – С. 56-61.
7. Ромпе Ян Д. Травматизм сухожилий и методы восстановительной терапии [Текст] / *Ян Д. Ромпе, Д. Фьюриа, Н. Маффулли* // Журнал костно-суставной хирургии. – 2008. – № 3. – С. 15–19.
8. Alhadlaq A. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics [Text] / *A. Alhadlaq* // Stem. Cells. Dev. – 2004. – Vol. 13, № 4. – P. 436–448.
9. Anjos-Afonso F. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions [Text] / *F. Anjos-Afonso, E.K. Siapati, D. Bonnet* // J Cell. Sci. – 2004. – Vol.117. – P. 5655-5664.
10. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon [Text] / *H.A. Awad, D.L. Butler, G.P. Boivin G.P et al.* // Tissue Eng. – 1999 – Vol. 5. – P. 267–277.
11. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells [Text] / *R. Bittencourt, H. Pereira, S. Felisbino et al.* // Acta Ortop. Bras. – 2006. – Vol. 14. – P. 22–24.
12. Rupture of the Achilles Tendon [Text] / *Ch.J. Bossley, B. Martinelli, N. Maffulli et al.* // J Bone Joint Surg Am. – 2000. – Vol.82. – P. 1804–1804.
13. Bhakta S. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation [Text] / *S. Bhakta, P. Hong, O. Koc* [Text] // Cardiovasc Revasc Med. – 2006. – Vol. 7, №1. – P. 19–24.
14. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics [Text] / *A.I. Caplan* // Tissue Engineering. – 2005. – Vol. 11. – P. 1198–1211.
15. Graham R. Tendinopathy – from basic science to treatment [Text] / *R. Graham* // Nature Clinical Practice Rheumatology. – 2008. – Vol. 4. – P. 82–89.
16. The influence of freezing and storage on the characteristics and functions of human mesenchymal stromal cells isolated for clinical use [Text] / *M. Haack-Sorensen, L. Bindsvlev, S. Mortensen et al.* [Text] // Cytotherapy. – 2007. – Vol. 9. – P. 328–337.
17. Jacobsson, J. Towards systematic prevention of athletics injuries: Use of clinical epidemiology for Evidence based injury prevention [Text] / *J. Jacobsson* // Linköping.: Sweden, 2012. – 71 p.
18. Karp J.M. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details [Text] / *J.M. Karp, G.S. Leng* // Stem Cell. – 2009. – Vol. 4. – P. 206–216.
19. Klingemann H. Mesenchymal stem cells –sources and clinical applications [Text] / *H. Klingemann, D. Matzlevich, J. Marchand* // Transfus. Med. Hemother. – 2008. – Vol. 35. – P.272–277.
20. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells [Text] / *M. Krampera, L. Cosmi, R. Angeli et al.* // Stem Cells. – 2006. – Vol. 24. –P. 386–398.
21. Le Blanc K. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system [Text] / *K. Le Blanc, D. Mougiakakos* // Nat Rev Immunol – 2012. – Vol. 12. – P. 383–396.
22. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke [Text] / *J.S. Lee, J.M. Hong, G.J. Moon et al.* // Stem Cells – 2010. – Vol. 28. – P. 1099–1106.
23. Molloy T. The roles of growth factors in tendon and ligament healing [Text] / *T Molloy, Y. Wang, G. Murrell* // Sports Medicine. – 2003. – Vol. 33. – P. 391–394.
24. Nourissat G. Mesenchymal stem cell therapy regenerates the native bone-tendon junction after surgical repair in a degenerative rat model [Text] / *G. Nourissat, A. Diop, N. Maurel* // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5. – P. 122–131.
25. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses [Text] / *S. Pacini, S. Spinabella, L. Trombi et al.* // Tissue Eng. – 2007. – Vol. 13. – P. 2949–2955.
26. Development of a refined tenocyte differentiation culture technique for tendon tissue engineering [Text] / *Y. Qiu, X. Wang, Y. Zhang et al.* // Cells Tissues Organs – 2013. – Vol. 197. – P. 27–36.
27. Rees J. D. Current concepts in the management of tendon disorders [Text] / *J. D. Rees, A. M. Wilson, R. L. Wolman* // Rheumatology. – 2006. – Vol. 45. – P. 508–521.
28. Stem cells in veterinary medicine—attempts at regenerating equine tendon after injury [Text] / *L.E. Richardson, J. Dudhia, P.D. Clegg et al.* // Trends Biotech. – 2007. – Vol. 25. – P. 409–416.
29. Ritty T. Distribution of the elastic fiber and associated proteins in flexor tendon reflects function [Text] / *T. Ritty, K. Ditsios, B. Starcher* // Anat. Record. – 2002. – Vol. 268. – P. 430–440.
30. Immunolocalization of collagens (I and III) and cartilage oligomeric matrix protein in the normal and injured equine superficial digital flexor tendon [Text] / *F. Södersten, K. Hultenby, D. Heinegard et al.* // Connective Tissue Research – 2013. – Vol. 54. – P. 62–69.
31. Tabera S. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes [Text] / *S. Tabera, J.A. Perez-Simon, M. Diez-Campelo* // Haematologica. – 2008. – Vol. 93. – P. 1301–1309.
32. The effects of bone marrow stromal cell transplants on tendon healing in vitro [Text] / *Ch. Zhao, H. Chieh, K. Bakri et al.* // Med. Eng. & Physics. – 2009. – Vol. 31. – P. 1271–1275.

Робота проведена за підтримки цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій», договір № 2.2.6.69.

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Стаття надійшла до редакції 15.01.2014 р.

Прийнята до друку 17.02.2014 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування.



СТАТТЯ НА САЙТІ  
TRANSPLANTOLOGY.ORG