

УДК 611.013.395:57.086.13
doi:10.22494/cot.v6i2.86

Потенціювання кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини щурів фактором BMP-12 *in vitro* для терапії тендопатії



Волкова Н. О., Юхта М. С., Гольцев А. М.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

e-mail: volkovana781@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Кісткові морфогенетичні білки (BMP), що входять до групи суперродини факторів TGF- β , мають стимулюючий ефект на кісткоутворення, а також на проліферацію теноцитів та фібробластів – складових компонентів тканини сухожилля.

МЕТА РОБОТИ – встановити вплив BMP-12 на морфофункціональні характеристики кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини щурів (ММСК-ЖТ) та дослідити на моделі тендопатії ефекти застосування ММСК-ЖТ, попередньо культивованих з BMP-12.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. ММСК отримували з жирової тканини щурів. Кріоконсервування здійснювали під захистом 10 % ДМСО з додаванням 20 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби зі швидкістю охолодження 1 °C/хв до -80 °C і подальшим перенесенням у рідкий азот. При культивуванні ММСК-ЖТ додавали фактор BMP-12 в концентрації 50 нг/мл. Оцінювали здатність клітин до проліферації (МТТ-тест) та синтезу колагену I та III типу. Щурам зі змодельованим дегенеративно-дистрофічним пошкодженням Ахіллових сухожилля в зону дефекту локально вводили по 0,25·10⁶ ММСК-ЖТ або ММСК-ЖТ+BMP-12. Контролем служили тварини з введенням фізіологічного розчину. На 21-у добу після терапії проводили гістологічне, імунофлуоресцентне та біомеханічне дослідження.

РЕЗУЛЬТАТИ. Застосування BMP-12 викликає зниження проліферації крММСК з жирової тканини у поєднанні зі збільшенням відносної кількості клітин, які синтезують колаген I та III типу відносно ММСК-ЖТ, культивованих за стандартних умов. Введення ММСК-ЖТ сприяє активізації регенеративних процесів в ушкоджених сухожиллях. Використання ММСК-ЖТ+BMP-12 пришвидшує відновлення гістологічної структури, міцності, вмісту колагену I та III типу в Ахіллових сухожиллях тварин з дегенеративно-дистрофічним ушкодженням у порівнянні з клітинами без додавання BMP-12.

ВИСНОВКИ. BMP-12 може бути використаний як стимулюючий агент для теногенного диференціювання ММСК-ЖТ перед трансплантацією в ушкоджену сухожилляну тканину.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини жирової тканини; BMP-12 ; колаген; тендопатія; клітинна терапія

Патології сухожилля є досить поширені та представляють собою складні клінічні випадки в ортопедії, головним чином тому, що вони погано піддаються лікуванню і потребують тривалої реабілітації [1, 2]. До таких пошкоджень відносять тендинози, тендиніти та паратендиніти, які мають травматичну, запальну або дегенеративну етіологію. Існуючі засоби терапії не забезпечують успішного довго-

строкового ефекту, а ушкоджені сухожилля не відновлюють у повній мірі свою структуру та функціональність [3-6].

Залучення біологічної складової в сучасній терапії ортопедичних захворювань представлено використанням факторів росту, стовбурових клітин, природних біоматеріалів та генів окремо або в комбінації *in situ* [7-9]. Найбільшою ефективністю в регенеративній медицині

характеризуються мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК), які на сьогодні виділяють з багатьох джерел: кістковий мозок, жирова тканина, шкіра, кордова кров та інші [10, 11]. ММСК можуть сприяти регенерації не лише шляхом прямої диференціації клітин, але і через секрецію факторів росту, які є одними з найбільш важливих багатофункціональних молекулярних родин, що беруть участь у відновленні ушкоджених тканин [10-14].

На сьогодні розуміння біології сухожилля значно відстає від розуміння інших скелетно-м'язових тканин, що ускладнює розробку нових варіантів лікування тендопатій. За останні роки були розроблені моделі *in vitro* та *in vivo* для обґрунтування можливості спрямованого диференціювання клітин у теногенному напрямку із залученням факторів росту і транскрипції та подальшим їх використанням для стимуляції регенеративних процесів в ушкоджених сухожиллях. Деякі цитокіни, включаючи кістково-морфогенетичні білки (bone morphogenetic proteins – BMP), трансформуючий фактор росту-бета (TGF- β), інсуліноподібний фактор росту (IGF), фактор росту ендотеліальних судин (VEGF) та фактор росту фібробластів (FGF), застосовуються для відновлення сухожильної тканини [15-19]. Однак не всі вивчені фактори можуть сприяти теногенному диференціюванню.

Кісткові морфогенетичні білки BMP, що входять до групи суперродини факторів TGF- β , мають стимулюючий ефект на кісткоутворення, а також на проліферацію теноцитів та фібробластів – складових компонентів тканини сухожилля. Серед цих цитокінів BMP-12, що також називається фактором росту та диференціювання 7 (GDF-7), показав найвищу здатність стимулювати відновлення сухожилля як *in vivo*, так і *in vitro* [15]. В роботі [16] показано, що культивування міобластів з BMP-12 призводило до зниження експресії міозину з утворенням багатоядерних клітин міотубул. Інгибує дія BMP-12 на міогенне диференціювання була аналогічна ефектам BMP-2, хоча і мала нижчу активність. Вплив BMP-12 на ММСК має різноспрямований характер, який залежить від джерела стовбурових клітин. У більшості робіт показано, що цей фактор сприяє теногенному диференціюванню ММСК та має дозозалежний ефект [17-19]. Більш глибоке розуміння функціонування сухожилля на тканинному і клітинному рівнях у поєднанні з практичним застосуванням сучасних молекулярних та клітинних інструментів може сприяти розробці ефективних терапевтичних засобів, специфічних для сухожилля.

Використання технологій культивування та кріоконсервування дозволяє отримувати запас стовбурових та спеціалізованих клітин, тривало їх зберігати при низьких температурах, вільно транспортувати та розморожувати безпосередньо перед застосуванням. Тому дослідження характеристик кріоконсервованих культур є актуальним напрямком сучасної біотехнології. У попередніх роботах ми дослідили морфофункціональні характеристики кріоконсервованих ММСК, отриманих з кісткового мозку, жирової та сухожильної тканин, та встановили, що ММСК з жирової тканини (ММСК-ЖТ) характеризувалися більшою здатністю до колонієутворення, проліферації та однаковою здатністю до спрямованого диференціювання у порівнянні з ММСК кісткового мозку [20].

Метою представленої роботи було встановити вплив BMP-12 на морфофункціональні характеристики кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини щурів та дослідити на моделі тендопатії ефекти застосування ММСК-ЖТ, попередньо культивованих з BMP-12.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Отримання та культивування ММСК-ЖТ. Первинну суспензію клітин жирової тканини отримували з біоптатів сальника безпородних щурів-самців віком 3 міс. (250 ± 25 г, $n = 5$) шляхом їх ферментативної дезагрегації. Для цього зразки тканин (75 ± 3 мг) промивали розчином Хенкса (PAA, Австрія) з гентаміцином в дозі 150 мкг/мл (Фармак, Україна) та інкубували у розчині колагенази II типу

з концентрацією 1,5 мг/мл (ЛанЕко, Росія) при 37 °C протягом 18 год. Клітини виділяли з біоптатів шляхом ресуспендування з наступним центрифугуванням при 840g протягом 3 хв. До осаду додавали середовище культивування та висівали на культуральні флакони (PAA, Австрія). Концентрацію клітин підраховували за допомогою камери Горяєва у світловому мікроскопі. Щільність посіву клітин становила $1 \cdot 10^4$ /см² культурального флакону.

Повне живильне середовище культивування містило: середовище IMDM (PAA, Австрія), 10 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби (HyClone, США), 150 мкг/мл канаміцину (Фармак, Україна) та 5 мкг/мл амфотерицину Б (PAA, Австрія). Живильне середовище змінювали кожні три доби. У роботі були використані стандартні умови культивування клітин при 37 °C в атмосфері 5 % CO₂ з використанням інкубатора (Sanyo, Японія). По досягненню моношару культури клітин субкультивували з використанням 0,25 % розчину трипсину та Версену у співвідношенні 1:1. В роботі використовували культури ММСК-ЖТ 2-го пасажу.

Кріоконсервування ММСК-ЖТ. Кріоконсервування культур ММСК-ЖТ здійснювали під захистом 10 % ДМСО (ЛанЕко, Росія) з додаванням 20 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби. Розчин кріопротектору готували на повному живильному середовищі культивування. Отримані суспензії вміщували у кріопробірки об'ємом 1 мл (Nunc, США). Швидкість охолодження складала 1 °C/хв до -80 °C з подальшим перенесенням у рідкий азот [21]. Зразки зберігали в умовах кріобанку протягом 2 місяців. Розморожування проводили на водяній бані при 40 °C до появи рідкої фази. Кріопротектор видаляли шляхом додаванням розчину Хенкса (PAA, Австрія) у співвідношенні 1:9 з подальшим центрифугуванням при 840g протягом 5 хв. При культивуванні ММСК-ЖТ застосовували такі ж умови, як і для початкових культур.

Застосування BMP-12 при культивуванні ММСК-ЖТ. Для визначення впливу рекомбінантного білка BMP-12 /GDF7 (Sigma-Aldrich, США, кат. №SPR4572-20UG) ММСК-ЖТ культивували протягом 12 діб (група ММСК-ЖТ+BMP-12) у базовому живильному середовищі з додаванням 50 нг/мл BMP-12 [22-24], зміну якого проводили через 3 доби. Культивування проводили з використанням культуральних флаконів площею 25 см² та 6-лункових планшетів (PAA, Австрія) в залежності від мети експерименту. Контролем були ММСК-ЖТ, культивовані за аналогічних умов без використання фактору.

Вплив BMP-12 на морфофункціональні характеристики ММСК-ЖТ. В досліджених культурах з додаванням та без додавання BMP-12 визначали кількість життєздатних клітин на термінах культивування 1, 3, 7, 12 діб за допомогою МТТ-тесту [25]. Вимірювання оптичної щільності розчину формазану в супернатанті проводили на фотометрі КФК-2-УХЛ42 при довжині хвилі 540 нм. Як контроль використовували культуральне середовище без клітин. На 12-у добу препарати клітин фіксували 4 % розчином параформальдегіду з наступним фарбуванням азуром-II і еозином за Романовським-Гімза.

Забарвлення культур ММСК-ЖТ на колагени I та III типу проводили з використанням первинних моноклональних антитіл до колагену I типу (mouse Anti-Collagen, Type I monoclonal antibody, Sigma-Aldrich, США, кат. №C2456) в титрі 1:2000, кон'югованих з CF[™]488A (Sigma-Aldrich, США, кат. №SCJ4600014), та антитіл до колагену III типу (rabbit anti-rat collagen type III polyclonal antibody, Millipore, США кат. №AB757P) в титрі 1:80 з вторинними антитілами goat anti-rabbit IgG Alexa Fluore 647 (Millipore, США, кат. № AP187SA6) відповідно. Препарати культур додатково фарбували люмінесцентним барвником DAPI (Sigma, США) в концентрації 1 мкг/мл протягом 30 хв. з метою візуалізації ядер клітин. Флуоресцентну мікроскопію проводили за допомогою конфокального скануючого мікроскопа LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Germany).

Моделювання дегенеративно-дистрофічного ушкодження Ахіллових сухожилля. Самцям щурів (вік 12-13 тижнів, маса 200 ± 25 г, $n = 45$) проводили моделювання експериментальної тендопатії шляхом ін'єкційного введення 0,03 мл розчину Дипроспана (Schering-Plough

Central East A.G., Швейцарія) в обидва Ахіллові сухожилля через 7 дів протягом три тижнів (загалом – 4 ін'єкції) [26, 27].

Трансплантація клітин. ММСК-ЖТ через 12 дів культивування з додаванням або без ВМР-12 (ММСК-ЖТ та ММСК-ЖТ+ВМР-12) субкультивували з використанням 0,25 % розчину трипсину та Версену у співвідношенні 1:1. Відмивання від середовища проводили шляхом додаванням розчину Хенкса у співвідношенні 1:9 з наступним центрифугуванням при 840g протягом 5 хв. До осаду додавали фізіологічний розчин та ресуспендували.

Через тиждень з моменту останньої ін'єкції Дипроспану тваринам локально вводили: контрольна група ($n = 15$) – фізіологічний розчин об'ємом 0,025 мл; дослідна група 1 ($n = 15$) – ММСК-ЖТ в дозі $0,25 \cdot 10^6$ клітин; дослідна група 2 ($n = 15$) – ММСК-ЖТ+ВМР-12 в дозі $0,25 \cdot 10^6$ клітин. Суспензію клітин вводили в обидва Ахіллових сухожилля дослідних тварин з тендопатією, відступивши на 0,25 см від п'яtkового горба. На 21 добу після проведення терапії тварин контрольної та дослідних груп виводили з експерименту шляхом гуманної евтаназії (асфіксія в атмосфері CO_2). Для гістологічного, імунофлуоресцентного та біомеханічного дослідження висікали сухожилля разом з місцем кріплення до п'яtkової кістки.

Оцінка ефективності клітинної терапії. Отримані зразки Ахіллових сухожилля для гістологічного дослідження фіксували в 10 % розчині формаліну та після зневоднення й знежирювання в ацетоні та етанолі наростаючої міцності заливали в целоїдин. Отримували гістологічні зрізи в сагітальній площині, які забарвлювали гематоксиліном та еозином. Щільність клітинних елементів на гістологічних препаратах визначали як середнє арифметичне підрахунків кількості ядер на одиниці площі зрізу сухожилля ($0,102 \text{ мм}^2$) з наступним перерахунком на 1 мм^2 .

Оцінку вмісту колагену I та III типу проводили на криостатних зрізах завтовшки 7 мкм, які забарвлювали по методиці, описаній вище для культур ММСК-ЖТ. За наявності аутолюмінесценції проводили її гасіння 0,3 M розчином гліцину (РАА, Австрія) протягом 20 хвилин з наступною повторною мікроскопією препаратів. Відносну площу ділянок позитивного забарвлення на колаген I та III типу вимірювали за допомогою програми Axiovision Real.4.7 та визначали її відсоток як співвідношення площі світіння до загальної площі зрізу сухожилля, яку приймали за 100 %.

Визначення міцності сухожилля проводили шляхом вимірювання руйнуючого навантаження при їх натягу – F (МПа) та визначали за формулою: $F = N/S$, де N – прикладене навантаження до виникнення розриву; S – площа перерізу сухожилля ($S = \pi \cdot a \cdot b$, де $\pi = 3,14$; a – висота; b – ширина перерізу) [28].

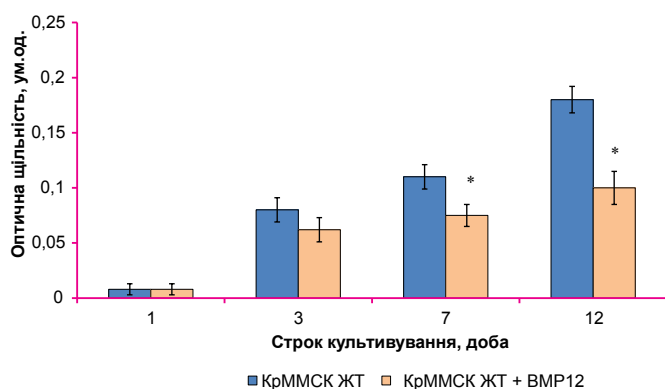


Рис. 1. Показники оптичної щільності розчину формазану в супернатанті за результатами МТТ-тесту для оцінки проліферації в динаміці культивування ММСК-ЖТ з додаванням ВМР-12 ($M \pm m$, $n = 15$).

Примітка: * – різниця значуща відносно контролю ($p < 0,05$).

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 з дотриманням «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених II Національним конгресом з біоетики (Київ, 2004 р.).

Статистична обробка результатів. Нормальність розподілу кількісних ознак визначали за спільним критерієм перевірки на симетричність і нульовим коефіцієнтом ексцесу. При нормальному розподілі змінних значущість відмінностей між групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента з використанням статистичних параметрів: M – середнє; m – стандартна помилка середнього; n – обсяг аналізованої групи; p – рівень значущості. Критичне значення рівня значущості приймалося рівним 0,05. Аналіз даних проводили з використанням пакетів програм «Microsoft Excel» (Microsoft, США) та «Statistika 8» (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив ВМР-12 на морфофункціональні характеристики ММСК-ЖТ. Результати МТТ-тесту представлені на **рис. 1**. На початкових строках культивування (1-3 доба) проліферативна активність клітин значуще не відрізнялася в усіх досліджених зразках. На 7-у та 12-у добу в культурах ММСК-ЖТ у присутності ВМР-12 досліджений показник був відповідно в 1,47 та в 1,8 раз нижче порівняно з відповідними показниками в ММСК-ЖТ культивованих за стандартних умов.

Вплив ВМР-12 на морфологічні характеристики та здатність до синтезу колагену I та III типу ММСК-ЖТ наведені на **рис. 2**. ММСК-ЖТ при культивуванні були представлені парусоподібними, зірчатоподібними та веретеноподібними клітинами (**рис. 2 А**). В контролі відносна кількість ММСК-ЖТ, що синтезували колаген I типу, складала $63,4 \pm 2,5$ % та колаген III типу – $45,2 \pm 3,1$ % (**рис. 2 Б, В**). Морфологічні зміни в ММСК-ЖТ під впливом ВМР-12 спостерігали, починаючи з 5-6-ї доби культивування, що мало прояв у переваженні веретеноподібних клітинних елементів у порівнянні з контролем (**рис. 2 Г**). Відносна кількість клітин в зразках ММСК-ЖТ+ВМР-12, які синтезували колаген I та III типу, складала $83,1 \pm 3,7$ % та $87,2 \pm 3,1$ % відповідно, що в 1,3 та 1,9 разу перевищувала відповідні значення ММСК-ЖТ, культивованих за стандартних умов (**рис. 2 Д, Е**).

Таким чином, додавання до середовища культивування ВМР-12 призводить до зниження проліферативної активності та активзації синтетичних процесів у ММСК-ЖТ, що вказує на зміни в функціональному статусі досліджених клітин під його впливом та опосередковано на можливість спрямованого теногенного диференціювання досліджених клітин.

Вплив терапії ММСК-ЖТ та ММСК-ЖТ+ВМР-12 на здатність до відновлення Ахіллових сухожилля за умов тендопатії. Аналіз результатів гістологічного дослідження препаратів Ахіллових сухожилля тварин контрольної групи свідчив про наявність патологічних змін, які мали прояв в дезорганізації сухожильних волокон та їх нерівномірному забарвленні (**рис. 3 А**). Ділянки світіння колагену I та III типу були не інтенсивними та мали дезорганізоване розташування (**рис. 3 Б, В**). Відносна площа світіння ділянок сухожилля, позитивно забарвлених на колаген I типу, складала $22,6 \pm 5,1$ % та на колаген III типу – $18,1 \pm 3,2$ %. Співвідношення колагенів I/III типу складало 1,25. Отримані дані свідчать про наявність дегенеративно-дистрофічних процесів в сухожиллях тварин контрольної групи.

В Ахіллових сухожиллях тварин з терапією ММСК-ЖТ було виявлено збільшення кількості та інтенсивності фарбування клітинних елементів в осередку патологічного процесу у порівнянні з контролем (**рис. 3 Г**). В структурі сухожильних волокон спостерігали поліпшення часткості контурів, зменшення хвилястості, рівномірне розташування ділянок колагену I та III типу та їх інтенсивне світіння (**рис. 3 Д, Е**). Відносна площа ділянок сухожилля, позитивно забарвлених на колаген

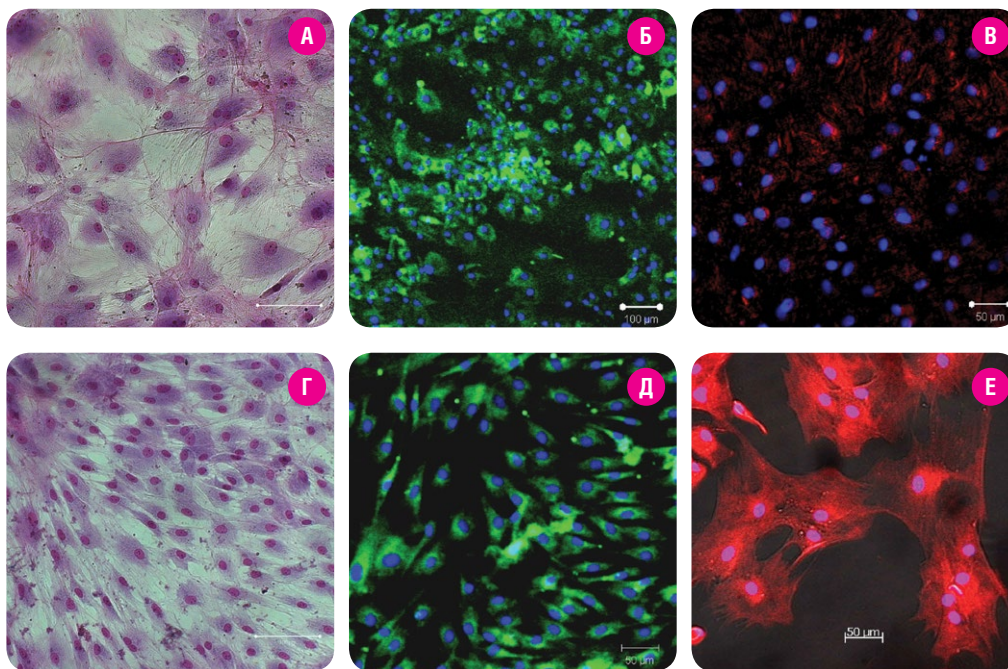


Рис. 2. Мікрофотографії культур ММСК-ЖТ (А-В) та ММСК-ЖТ+ВМР-12 (Г-Е), 12-а доба культивування. Світлова мікроскопія (А, Г), забарвлення азуром-II і еозином. Флуоресцентна мікроскопія, імуноцитохімічне забарвлення на колаген I типу (Б, Д – зелений колір) та на колаген III типу (В, Е – червоний колір), ядра забарвлені DAPI (блакитний колір).

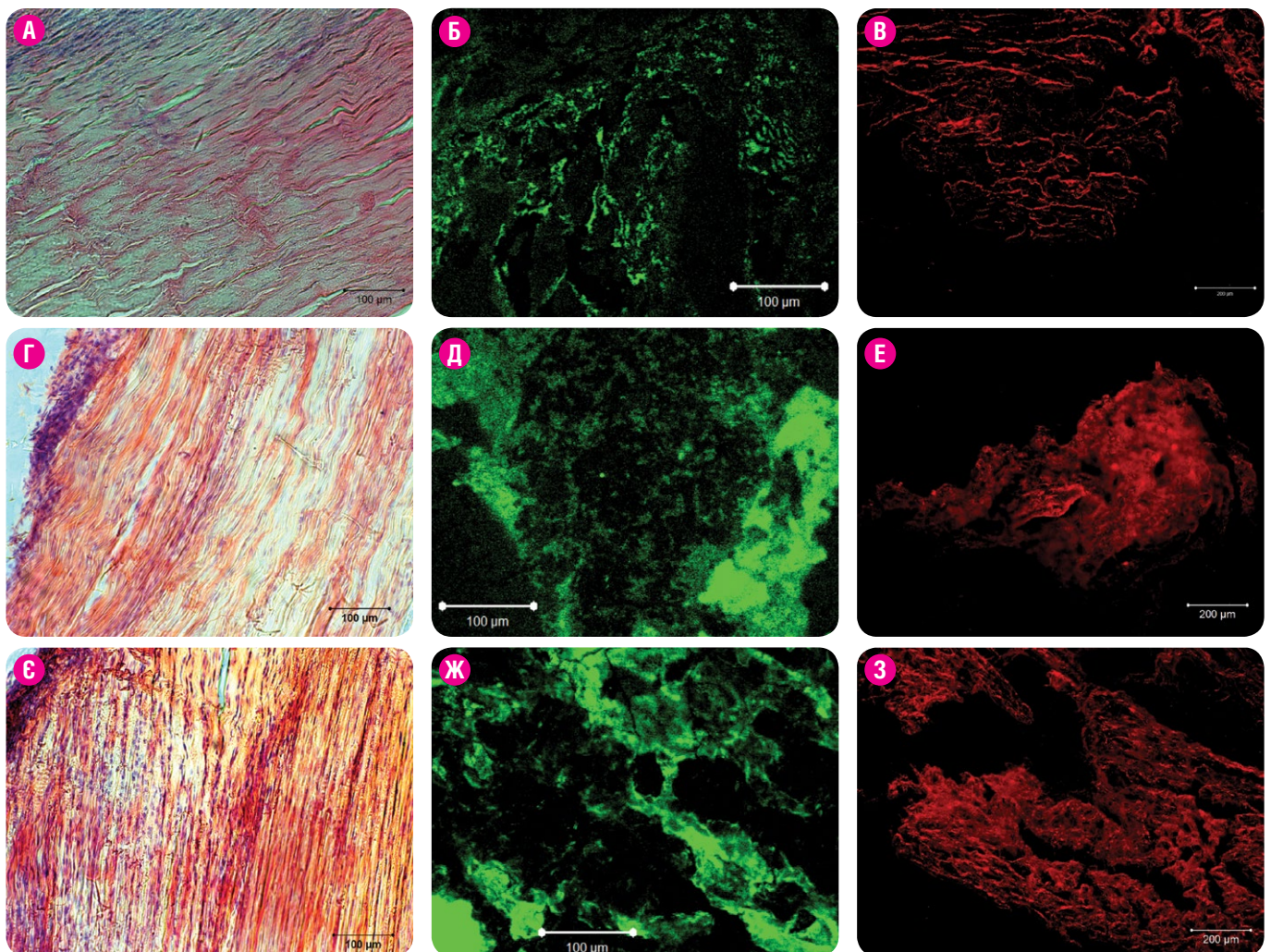


Рис. 3. Мікрофотографії препаратів Ахілових сухожиль щурів, 21 доба після введення клітин. Контроль (А-В), ММСК-ЖТ (Г-Е) та КрМСК-ЖТ+ВМР-12 (З-З). Світлова мікроскопія (А, Г, З), забарвлення гематоксиліном і еозином. Флуоресцентна мікроскопія, імуногістохімічне забарвлення на колаген I типу (Б, Д, Ж – зелений колір) та на колаген III типу (В, Е, З – червоний колір).

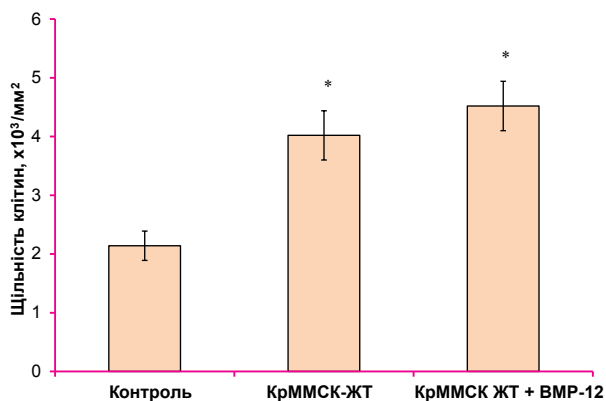


Рис. 4. Щільність клітин на гістологічних зрізах Ахіллових сухожилів щурів через 21 добу після терапії ММСК-ЖТ ($M \pm m$, $n = 15$).

Примітка: * – різниця достовірна відносно контролю ($p < 0,05$).

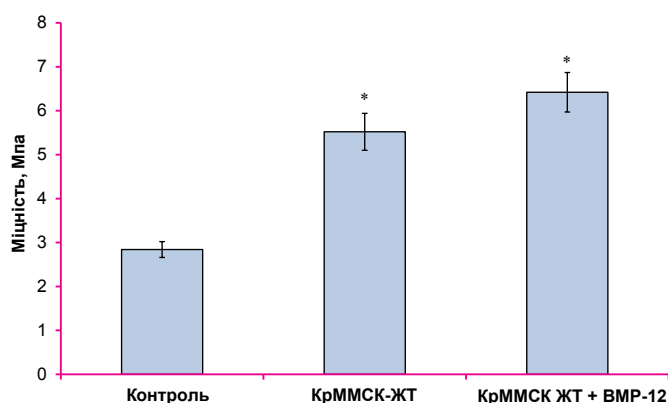


Рис. 5. Міцність Ахіллових сухожилів на розрив у тварин через 21 добу після терапії ММСК-ЖТ ($M \pm m$, $n = 15$).

Примітка: * – різниця достовірна відносно контролю ($p < 0,05$).

I типу, складала $51,5 \pm 6,1\%$ та колаген III типу – $26,7 \pm 2,1\%$. Співвідношення колагенів I/III складало 1,93, що в 1,5 разу перевищувало показник контрольної групи.

За умов введення ММСК-ЖТ+ВМР-12 в ділянках зони ушкодження відмічали збільшення кількості клітинних елементів, зменшення хвилястості і дезорганізації сухожильних волокон, які мали рівномірне, інтенсивне забарвлення на колаген I та III типу по краях та центру препаратів (рис. 3 Ж, З). Відносна площа світіння ділянок сухожилів, позитивно забарвлених на колаген I типу, складала $59,7 \pm 5,8\%$ та колаген III типу – $28,2 \pm 3,13\%$. Співвідношення колагенів I/III становило 2,12, тобто було в 1,7 разу вище відповідного показника контрольної групи.

За даними літератури, колаген I типу забезпечує каркасну міцність тканини, а колаген III типу забезпечує її еластичність. На підставі результатів дослідження якісного складу і відносної площі ділянок досліджуваних типів колагену в зоні дегенеративно-дистрофічного процесу Ахіллових сухожилів у тварин контрольної та дослідних груп можна зробити висновок про активізацію синтезу колагену у тварин з терапією як ММСК-ЖТ, так і ММСК-ЖТ+ВМР-12.

Наступним етапом роботи було проведення морфометричного дослідження гістологічних зрізів сухожилів тварин з тендопатією після терапії ММСК-ЖТ та ММСК-ЖТ+ВМР-12 (рис. 4). В контрольній групі спостерігали низьку щільність клітинних елементів в тканині сухожилів. В Ахіллових сухожиллях тварин з терапією ММСК-ЖТ досліджений показник був вище в 1,8 разу відносно контролю. У тварин з введенням ММСК-ЖТ+ВМР-12 щільність клітин в тканині сухожилів була вище в 2,6 разу відносно контролю. Слід зазначити, що в препаратах тварин з терапією ММСК-ЖТ+ВМР-12 досліджений показник був вищим і в порівнянні з ММСК-ЖТ. Наведені зміни в Ахіллових сухожиллях тварин після клітинної терапії характеризують високу проліферативну активність клітин в осередку патологічного вогнища.

Для об'єктивізації виявлених якісних змін додатково було проведено вимірювання міцності Ахіллових сухожилів на розрив. Отримані дані за загальною тенденцією відповідали наведеним вище результатам гістологічного, морфометричного та імунофлуоресцентного досліджень (рис. 5). Показник міцності сухожилів в групі з терапією

ММСК-ЖТ був більшим в 1,9 разу, а в групі з введенням ММСК-ЖТ+ВМР-12 – в 2,4 разу порівняно з контролем.

Потенційне використання факторів росту та диференціювання в клітинній терапії потребує попереднього вивчення їх впливу на такі клітинні характеристики, як морфологія, проліферація та синтетичні процеси. Отримані в нашій роботі результати, показали, що застосування ВМР-12 при культивуванні ММСК-ЖТ інгібувало проліферацію та збільшувало синтетичну активність клітин. Загальновідомо, що процеси диференціювання в такі тканини, як кістки, м'язи, хрящі або сухожилля, пов'язані зі значним зниженням проліферативної активності стовбурових клітин.

В роботі Violini S. та співавтор. було показано, що застосування ВМР-12 стимулює теногенне диференціювання ММСК кісткового мозку, що мало прояв в підвищенні експресії маркерів сухожильної тканини, включаючи теномодулін та декорин [22]. Однак слід зазначити, що вплив ВМР на клітинну проліферацію варіює залежно від типів клітин та різних видів цього фактора [29, 30]. За даними ряду авторів [25], застосування ВМР-12 не впливало на міграційну активність ММСК та призводило до активації теногенного диференціювання, секреторної активності та зниження імуномодулюючого потенціалу, що є важливим моментом для обґрунтування методу введення клітин з терапевтичною метою.

Представлені в нашій роботі експериментальні дані гістологічного, морфометричного, імунофлуоресцентного та біомеханічного дослідження свідчили, що введення ММСК-ЖТ та ММСК-ЖТ, культивованих з ВМР-12, в товщу дегенеративно-дистрофічно зміненого Ахіллового сухожилля сприяло нормалізації структурно-функціональної організації тканини, вмісту колагенів I та III типу та мало позитивний вплив на показник міцності порівняно з контрольною групою. Наведена різниця між контрольною та дослідними групами свідчить про здатність ММСК-ЖТ впливати на процеси відновлення уражених сухожилів. Слід зазначити, що інтенсивність регенеративно-репаративних процесів за умов використання ММСК-ЖТ була менш виражена у порівнянні з ММСК-ЖТ, культивованих з ВМР-12. Однак залишається відкритим питання про більш віддалені ефекти клітинної терапії, зокрема, тривалість пригнічення дегенеративно-дистрофічного процесу та можливу необхідність повторного застосування клітин.

ВИСНОВКИ

Застосування BMP-12 при культивуванні кріоконсервованих ММСК-ЖТ викликає зниження їх проліферативної активності та посилює синтез колагену I та III типу. Локальне введення ММСК-ЖТ та ММСК-ЖТ, культивованих з BMP-12, стимулює репаративно-регенеративні процеси в ушкоджених сухожиллях у щурів із змодельованою тендопатією. Застосування ММСК ЖТ, культивованих з BMP-12, порівняно із звичайними ММСК-ЖТ є більш ефективним у відновленні гістологічної будови, міцності, вмісту колагенів I і III типу та їх співвідношення в Ахіллових сухожиллях тварин з дегенеративно-дистрофічним ушкодженням. Отримані результати можуть бути використані для обґрунтування та розробки методик лікування дегенеративно-дистрофічних уражень сухожиль у клінічній практиці.

Робота проведена за підтримки цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства», договір № 2.2.6.94.

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Boyer M. I., Goldfarb C. A., Gelberman R. H. Recent progress in flexor tendon healing: the modulation of tendon healing with rehabilitation variables. *Journal of Hand Therapy*. 2005. **18**, № 2. P. 80-85.
2. Graham R. Tendinopathy – from basic science to treatment. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2008. **4**, № 2. P. 82-89.
3. Maffulli N. Overuse tendon conditions: time to change a confusing terminology. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 1998. **14**, № 8. P. 840-843.
4. Sharma P., Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *JBJS*. 2005. **87**, № 1. P. 187-202.
5. Dyment N. A., Galloway J. L. Regenerative biology of tendon: mechanisms for renewal and repair. *Current molecular biology reports*. 2015. **1**, № 3. P. 124-131.
6. Tozer S., Duprez D. Tendon and ligament: development, repair and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005. **75**, № 3. P. 226-236.
7. Docheva D., Müller S.A., Majewski M., Evans C.H. Biologics for tendon repair. *Advanced drug delivery reviews*. 2015. **84**. P. 222-239.
8. Voleti P. B., Buckley M. R., Soslowsky L. J. Tendon healing: repair and regeneration. *Annu. Rev Biomed Eng*. 2012. **14**. P. 47-71.
9. Fang F., Lake S. Experimental evaluation of multiscale tendon mechanics. *Journal of Orthopaedic Research*. 2017. **35**, № 7. P. 1353-1365.
10. Кирик В. М., Бутенко Г. М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине (обзор литературы). *Журнал Академії медичних наук України*. 2010. **16**, № 4. С. 576-604.
11. Hegyi B., Sagi B., Kovacs J. Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall. *Int Immunology*. 2010. **22**, № 7. P. 551-559.
12. Volkova N., Yukhta M., Goltsev A. Cryopreserved Mesenchymal Stem Cells Stimulate Regeneration in an Intervertebral Disc. *Biomedicines*. 2015. **3**, № 3. P. 237-247.
13. Rybachuk O. A., Kyryk V. M., Poberezhny P. A., et al. Effect of the bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells to the neural tissue after ischemic injury *in vitro*. *Cell and Organ Transplantation*. 2014. **2**, № 1. P. 74-78.
14. Volkova N. A., Yukhta M. S., Yurchuk T. A., et al. Multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow in therapy of chronic inflammation of murine ovaries. *Biotechnologia Acta*. 2014. **7**, № 5. P. 35-42.
15. Molloy T., Wang Y., Murrell G.A.C. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Medicine*. 2003. **33**, № 5. P. 381-394.
16. Inada M., Katagiri T., Akiyama S., et al. Bone morphogenetic protein-12 and -13 inhibit terminal differentiation of myoblasts, but do not induce their differentiation into osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996. **222**, № 2. P. 317-322.
17. Costa M. A., Wu C., Pham B. V., et al. Tissue engineering of flexor tendons: optimization of tenocyte proliferation using growth factor supplementation. *Tissue engineering*. 2006. **12**, № 7. P. 1937-1943.
18. Folkman J., Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*. 1987. **235**, № 4787. P. 442-447.
19. Dai L., Hu X., Zhang X., et al. Different tenogenic differentiation capacities of different mesenchymal stem cells in the presence of BMP-12. *Journal of translational medicine*. 2015. **13**, № 1. P. 200.
20. Volkova N. A., Yukhta M. S., Goltsev A. N. Morphological and functional characteristics of cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow, adipose tissue and tendons. *Cell and Organ Transplantation*. 2016. **4**, № 2. P. 200-205.
21. Volkova N. A., Goltsev A. N. Cryopreservation effect on proliferation and differentiation potential of cultured chorion cells. *CryoLetters*. 2015. **36**, № 1. P. 25-29.
22. Violini S., Ramelli P., Pisani L. F., et al. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by *in vitro* exposure to BMP-12. *BMC cell biology*. 2009. **10**, № 1. P. 29.
23. Zarychta-Wiśniewska W., Burdzinska A., Kulesza A., et al. BMP-12 activates tenogenic pathway in human adipose stem cells and affects their immunomodulatory and secretory properties. *BMC cell biology*. 2017. **18**, № 1. P. 13.
24. Liu J., Tao X., Chen L., et al. CTGF positively regulates BMP12 induced tenogenic differentiation of tendon stem cells and signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015. **35**, № 5. P. 1831-1845.

25. *Mossman T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983. **65**, № 1-2. P. 55-63.
26. Council of Europe [France]. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg, 18.III.1986, <http://conventions.coe.int/treaty/en/Treaties/Word/123.doc>
27. *Коструб О. О., Бруско А. Т., Блонський Р. І., та ін.* Модель дегенеративно-дистрофічного ураження сухожилля (експериментальне дослідження). *Вісн. ортопед. травматол. та протезув.* 2009. **3**. С. 26-28.
28. *Коструб О. О., Блонський Р. І., Лазарев І. А., та ін.* Міцність сухожилля на розтягування після клітинної терапії його дегенеративного пошкодження в експерименті. *Вісн ортопед травматол та протезув.* 2011. **3**. С. 23-26.
29. *Stewart A., Guan H., Yang K.* BMP-3 promotes mesenchymal stem cell proliferation through the TGF-beta/activin signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2010. **223**, № 3. P. 658-66.
30. *Rodrigues M., Griffith L.G., Wells.* Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells. *Stem cell research & therapy.* 2010. **1**, № 4. С. 32.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 18.08.2018 р.

Прийнята до друку 30.11.2018 р.