

УДК 616.75-002.16-092.9:611.013.395](045)

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872024365-69>

Вплив культури фібробластних клітинних елементів на показники метаболізму сполучної тканини в експериментальних тварин

С. Магомедов, Ю. В. Поляченко, О. О. Коструб, Р. І. Блонський, І. А. Засаднюк

ДУ «Національний інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ

The number of patients with degenerative tendon disease affects millions of people both among athletes and the general population, causing significant socio-economic consequences. Despite the availability of various methods of conservative and surgical treatment, more than a third of patients experience constant pain. Objective. To study the indicators of the metabolism of connective tissue in animals with a model of degenerative damage to tendons against the background of the introduction of a culture of fibroblastic cell elements. Methods. Therefore, the development of methods for restoring the structure of tendons using cell cultures, in particular fibroblasts, will allow to optimize the course of reparative processes, reduce the risk of complications during surgical intervention and accelerate healing, and at the molecular level — to improve the structure of collagen fibers. Laboratory studies of biochemical markers of a tendon with a degenerative-dystrophic lesion and against the background of the introduction of cell culture can help in the differential diagnosis of its extracellular matrix. Results. The experimental data obtained by us indicate the presence of differences in the biochemical markers of tendons with degenerative-dystrophic lesions in rats 7, 21, and 45 days after the introduction of culture of fibroblastic cell elements. However, 45 days after the introduction of the culture of fibroblast cell elements, the normalization of metabolic processes in the extracellular matrix of connective tissue occurs, namely, the activity of collagenase and the concentration of protein-bound hydroxyproline approaches normal values. This indicates the predominance of the synthetic phase over the catabolic one in collagen metabolism. Conclusions. In this context, the introduction of culture of fibroblastic cell elements, as an alternative anti-inflammatory method, may provide another potential opportunity in the treatment of chronic degenerative-dystrophic lesions of the Achilles tendon. Keywords. Collagenase, hydroxyproline, glycosaminoglycans, fibroblasts, tendon damage.

Кількість хворих із дегенеративним ураженням сухожильків постійно зростає як серед спортсменів, так і між населення взагалі, спричиняючи водночас значні соціально-економічні наслідки. Незважаючи на наявність різноманітних способів консервативного та хірургічного лікування, більше третини пацієнтів відчують постійний біль. Мета. Вивчити показники метаболізму сполучної тканини у тварин із моделлю дегенеративного ушкодження сухожильків на тлі введення культури фібробластних клітинних елементів. Методи. Розробка способів відновлення структури сухожильків із використанням клітинних культур, зокрема фібробластів, дозволить оптимізувати перебіг репаративних процесів, знизити ризик ускладнень під час хірургічного втручання та прискорити загоєння, а на молекулярному рівні — покращити структуру колагенових волокон. Лабораторні дослідження біохімічних маркерів сухожильків із дегенеративно-дистрофічним ураженням на тлі введення культури клітин можуть допомогти в диференціальній діагностиці його позаклітинного матриксу. Результати. Експериментальні дані вказують на наявність у щурів відмінностей біохімічних маркерів сухожильків із дегенеративно-дистрофічним ураженням через 7, 21, і 45 днів після введення культури фібробластних клітинних елементів. Проте через 45 днів після введення відбувається нормалізація метаболічних процесів у позаклітинному матриксі сполучної тканини, а саме активність колагенази та концентрація білковозв'язаного гідроксипроліну наближується до нормальних величин. Це свідчить про переважання в метаболізмі колагену синтетичної фази над катаболічною. Висновки. Введення культури фібробластних клітинних елементів, як альтернативний протизапальний спосіб, може надати ще одну потенційну можливість для лікування хронічних дегенеративно-дистрофічних уражень ахіллового сухожилка.

Ключові слова. Колагеназа, гідроксипролін, глікозаміноглікани, фібробласти, ураження сухожильків

Вступ

Розробка нових високотехнологічних методик лікування хворих із дегенеративним ураженням сухожилків зараз є дуже важливою. Оскільки існуючі способи не можуть забезпечити повного та стійкого лікування ускладнень, які супроводжують їхні ураження — біологічні та біомеханічні функції сполучної тканини повністю не відновлюються [1, 2]. Труднощі лікування пояснюються нечисленністю вмісту клітинних елементів у тканинах сухожилків взагалі, і особливо в разі дегенеративних змін.

Нові стратегії лікування хворих сконцентровані на трансплантації чи мобілізації *in situ* мезенхімальних попередників чи стовбурових клітин, які активізують репаративні процеси [3, 4]. Розробка методик відновлення структури сухожилків із використанням клітинних культур, зокрема фібробластів, дозволить оптимізувати перебіг репаративних процесів, знизити ризик ускладнень у разі хірургічного втручання та прискорити загоєння, а на молекулярному рівні — покращити структуру колагенових волокон. Із цього погляду важливим є проведення експериментальних досліджень, зокрема біохімічних [5–7].

У хребетних сухожилки здебільшого складаються з тісно розташованих пучків паралельних колагенових фібрил типу I, пов'язаних малими молекулами протеогліканів. Специфічна просторова організація забезпечує їхні механічні властивості [8]. Дегенеровані сухожилки мають значно більше колагену типу III. Окрім того в них відбувається дезорганізація колагену з відокремленням колагенових волокон, збільшенням клітинності, неоваскуляризацією та фокальним некрозом [9].

Лабораторні дослідження біохімічних маркерів сухожилків із дегенеративно-дистрофічним ураженням і введення культури клітин можуть допомогти в диференціальній діагностиці їх позаклітинного матриксу. Так, визначення активності колагенази в біологічних рідинах необхідне для оцінювання метаболізму колагену в них у разі захворювань, які супроводжуються деструктивними процесами в сполучній тканині. Гідроксипролін є біомаркером для основних колагенів сухожилків типу I і III. Його вміст у крові відображає баланс швидкості катаболізму колагену. Співвідношення вільної та білковозв'язаної фракцій гідроксипроліну відповідно вказує на переважання процесів синтезу чи розпаду колагену [10]. Характерною ознакою дегенеративно-дистрофіч-

ного ураження сухожилків є втрата матриксом глікозаміногліканів (ГАГ), яка призводить до надлишкової гідратації та розщеплення матриксу з подальшим його зневодненням і розривом колагенових волокон [9, 10].

Мета: вивчити показники метаболізму сполучної тканини у тварин із моделлю дегенеративного ушкодження сухожилків на тлі введення культури фібробластних клітинних елементів.

Матеріал і методи

Дослідження виконано на 47 статевозрілих щурах-самцях, масою (300 ± 12) г. Усі маніпуляції з тваринами здійснювали відповідно до вимог біоетики та принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей [11]. Матеріали роботи розглянуто на засіданні комітету з біоетики при ДУ «ІТО НАМН України (протокол № 5 від 07.12.2023 року).

У всіх тварин моделювали дегенеративно-дистрофічне ураження ахілового сухожилка за розробленим методом [12]. Через 7 діб після отримання цієї травми в товщу ахілового сухожилка щурів, на 0,25 см проксимальніше п'яткових пагорбів одноразово вводили 0,1 мл культури фібробластних клітинних елементів, взятих з аутологічної дерми (концентрація — $0,25 \times 10^6$ клітин в 1 мл). За фізіологічну норму вважали показники 10 інтактних тварин. Контрольній групі щурів вводили натрію хлорид.

Використовували культури клітин фібробластів аутологічної шкіри, розроблені за методиками відділу кріобіології репродуктивних систем ДУ «Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України» (Харків) [13]. Із досліду щурів вводили шляхом декапітації на 7, 21 та 45 добу.

У сироватці крові цих тварин визначали такі показники: активність колагенази, фракції гідроксипроліну та глікозаміноглікани. Активність колагенази визначали за Lindy [14]. Фракції гідроксипроліну виділяли за Frey [15]. Гідроксипролін (ГП) у фракціях визначали за Stegemann [16]. Загальний вміст глікозаміногліканів визначали за методом Кляцкіна та Ліфшиця [17].

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали з використанням пакета програми Origin Pro 8,5. Вивчали середні значення отриманих показників (\bar{x}) зі стандартними відхиленнями (SD). Із метою оцінювання значущості різниці, за наявності нормального розподілу результатів дослідження, застосовували t-критерій Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Дані, отримані під час дослідження сироватки крові в тварин із моделлю дегенеративного ушкодження сухожилків, яким вводили культуру фібробластів, указують на те, що активність ферменту колагенази на 7 добу спостереження склала ($5,40 \pm 0,12$) мкмоль/л-год і перевищила норму більш ніж у 1,9 разу, досягаючи 193 %. Поряд із високою активністю цього ферменту зростає і вміст вільної фракції гідроксипроліну, що свідчить про високу катаболічну активність метаболізму основного білка сполучної тканини — колагену. Концентрація білковозв'язаного гідроксипроліну перевищує фізіологічну норму в 1,6 разу і становить ($14,80 \pm 0,50$) мкмоль/л-год (норма ($9,14 \pm 0,16$) мкмоль/л-год). Вміст ГАГ впав до нормальних показників — 21 %.

Значення на 7 добу після додавання культури фібробластів свідчать про активацію метаболічних процесів у сполучній тканині, які можна пояснити початковою транзиторною запальною реакцією на введення тромбоцитів. Дослідження *in vitro* Хадженса [18] продемонструвало, що однією з ранніх реакцій на застосування фібробластів у щурів є періодичні спалахи запалення. Вони спостерігали активацію шляхів прозапального фактора некрозу пухлини TNF-

альфа та NFκB після впливу фібробластів, а також експресію генів, пов'язаних із клітинною проліферацією та ремоделюванням колагену сухожилків.

Результати дослідження сироватки крові на 21 добу спостереження показують, що активність колагенази знижується порівняно з даними на 7 добу з 195 до 132 %, а в абсолютних показниках — до ($3,70 \pm 0,12$) мкмоль/л-год. Водночас необхідно відзначити, що ці показники знаходяться все ще вище за фізіологічну норму. У ці терміни знижується і вміст вільної фракції гідроксипроліну до 150 % проти маркерів 7 доби. Концентрація білковозв'язаного гідроксипроліну зростає до ($16,90 \pm 0,40$) мкмоль/л-год. Також підвищується вміст ГАГ (таблиця, рис. 2). У разі хронічних тендинопатій гострий спалах запалення може бути ключовим елементом у запуску наступної регенеративної відповіді. Це також може частково підтримувати позитивний результат введення фібробластів за хронічної дегенерації сухожилків [9, 18].

Дані, отримані на 45 добу спостереження, свідчать про подальше зниження активності колагенази до нормальних величин. Концентрація вільної фракції гідроксипроліну нижча за фізіологічну норму і становить 85 %, а в абсолютних показниках — ($7,29 \pm 0,35$) мкмоль/л-год.

Таблиця

Біохімічні показники сироватки крові щурів, яким вводили фібробласти, ($M \pm m$)

Показник	Фізіологічна норма (n = 10)	Контрольна група (n = 10)	7 доба (n = 10)	21 доба (n = 9)	45 доба (n = 8)
Колагеназа, мкмоль/л-год	$2,80 \pm 0,15$	$4,90 \pm 0,10^*$	$5,40 \pm 0,12^*$	$3,70 \pm 0,12^*$	$2,90 \pm 0,11^*$
Вільна фракція ГП, мкмоль/л-год	$8,59 \pm 0,43$	$12,70 \pm 0,35^*$	$13,70 \pm 0,17^*$	$12,88 \pm 0,40^*$	$7,29 \pm 0,35$
Білковозв'язана фракція ГП, мкмоль/л-год	$9,14 \pm 0,16$	$3,00 \pm 0,35^*$	$14,80 \pm 0,50^*$	$16,90 \pm 0,40$	$10,70 \pm 0,50^*$
ГАГ, г/л	$0,057 \pm 0,003$	$0,087 \pm 0,01^*$	$0,012 \pm 0,005^*$	$0,032 \pm 0,004^*$	$0,035 \pm 0,006^*$

Примітки. * — $P < 0,05$ по відношенню до норми. Норма — показники інтактних тварин.

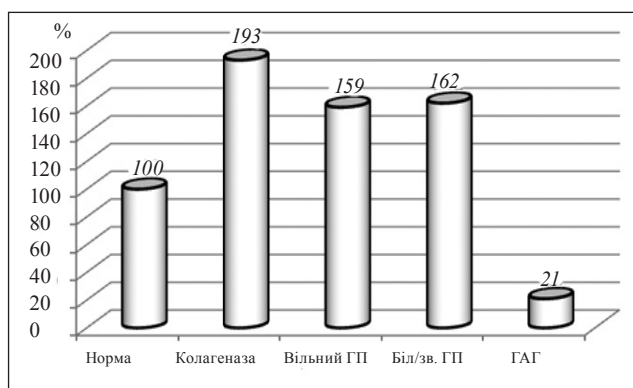


Рис. 1. Біохімічні показники сироватки крові тварин, яким вводили культуру фібробластів (7 доба)

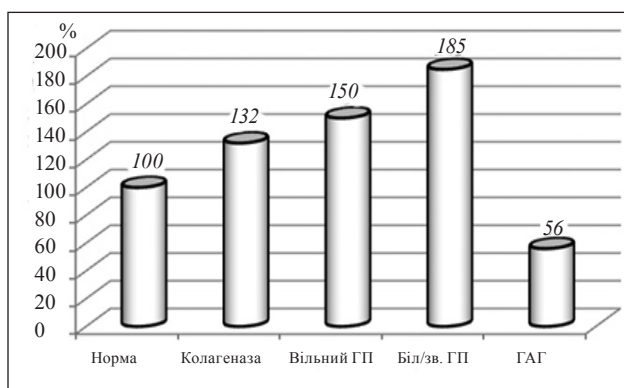


Рис. 2. Біохімічні показники сироватки крові тварин, яким вводили культуру фібробластів (21 доба)

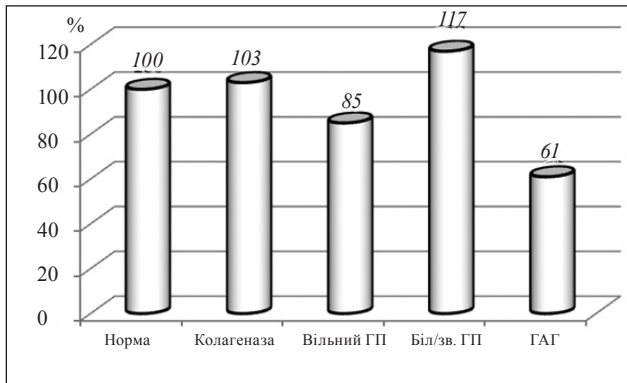


Рис. 3. Біохімічні показники сироватки крові тварин, яким вводили культуру фібробластів (45 доба)

Одночасно вміст білковозв'язаного гідроксипроліну наближається до норми, що свідчить про переважання в метаболізмі колагену синтетичної фази над катаболічною. Вміст ГАГ досягає $(0,035 \pm 0,006)$ г/л за норми $(0,057 \pm 0,003)$ г/л (таблиця, рис. 3).

У сукупності ці дані вказують на наявність у щурів відмінностей біохімічних маркерів сухожилків із дегенеративно-дистрофічним ураженням через 7, 21, і 45 діб після введення культури фібробластних клітинних елементів. Проте через 45 діб після введення цих клітинних елементів відбувається нормалізація метаболічних процесів у позаклітинному матриксі сполучної тканини, а саме активність колагенази та концентрація білковозв'язаного гідроксипроліну наближується до нормальних величин. Це свідчить про переважання в метаболізмі колагену синтетичної фази над катаболічною. У цьому контексті введення культури фібробластних клітинних елементів, як альтернативний протизапальний спосіб, може надати ще одну потенційну можливість у лікуванні хронічних дегенеративно-дистрофічних уражень ахілового сухожилка.

Висновки

Отримані дані вказують на наявність у щурів відмінностей біохімічних маркерів сухожилків із дегенеративно-дистрофічним ураженням через 7, 21, і 45 діб після введення культури фібробластних клітинних елементів.

Через 45 діб після введення культури фібробластних клітинних елементів відбувається нормалізація метаболічних процесів у позаклітинному матриксі сполучної тканини сухожилків.

Визначення біохімічних маркерів сухожилків із дегенеративно-дистрофічним ураженням мо-

жуть допомогти в диференціальній діагностиці його позаклітинного матриксу.

Конфлікт інтересів. Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Список літератури

1. Abat, F., Alfredson, H., Cucchiari, M., Madry, H., Marmotti, A., Mouton, C., Oliveira, J. M., Pereira, H., Peretti, G. M., Spang, C., Stephen, J., Van Bergen, C. J., & De Girolamo, L. (2018). Current trends in tendinopathy: Consensus of the ESSKA basic science committee. Part II: treatment options. *Journal of Experimental Orthopaedics*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40634-018-0145-5>
2. Winnicki, K., Ochała Kłos, A., Rutowicz, B., Pękala, P. A., & Tomaszewski, K. A. (2020). Functional anatomy, histology and biomechanics of the human Achilles tendon — A comprehensive review. *Annals of Anatomy — Anatomischer Anzeiger*, 229, 151461. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2020.151461>
3. Tognoloni, A., Bartolini, D., Pepe, M., Di Meo, A., Porcellato, I., Guidoni, K., Galli, F., & Chiaradia, E. (2023). Platelets rich plasma increases antioxidant defenses of Tenocytes via Nrf2 signal pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13299. <https://doi.org/10.3390/ijms241713299>
4. Ding, L., Wang, M., Qin, S., & Xu, L. (2021). The roles of MicroRNAs in tendon healing and regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.687117>
5. Abbasi, S., Sinha, S., Labit, E., Rosin, N. L., Yoon, G., Rahmani, W., Jaffer, A., Sharma, N., Hagner, A., Shah, P., Arora, R., Yoon, J., Islam, A., Uchida, A., Chang, C. K., Stratton, J. A., Scott, R. W., Rossi, F. M., Underhill, T. M., ... Biernaskie, J. (2021). Distinct regulatory programs control the latent regenerative potential of dermal fibroblasts during wound healing. *Cell Stem Cell*, 28(3), 581–583. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.02.004>
6. Buechler, M. B., Pradhan, R. N., Krishnamurthy, A. T., Cox, C., Calviello, A. K., Wang, A. W., Yang, Y. A., Tam, L., Caothien, R., Roose Girma, M., Modrusan, Z., Arron, J. R., Bourgon, R., Müller, S., & Turley, S. J. (2021). Cross-tissue organization of the fibroblast lineage. *Nature*, 593(7860), 575–579. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03549-5>
7. Guerrero Juarez, C. F., Dedhia, P. H., Jin, S., Ruiz Vega, R., Ma, D., Liu, Y., Yamaga, K., Shestova, O., Gay, D. L., Yang, Z., Kessenbrock, K., Nie, Q., Pear, W. S., Cotsarelis, G., & Plikus, M. V. (2019). Single-cell analysis reveals fibroblast heterogeneity and myeloid-derived adipocyte progenitors in murine skin wounds. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08247-x>
8. Gaut, L., & Duprez, D. (2015). Tendon development and diseases. *WIREs Developmental Biology*, 5(1), 5–23. <https://doi.org/10.1002/wdev.201>
9. Klatt-Schulz, F., Minkwitz, S., Schmock, A., Bormann, N., Kurtoglu, A., Tsitsilonis, S., Manegold, S., & Wildemann, B. (2018). Different Achilles tendon pathologies show distinct histological and molecular characteristics. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 404. <https://doi.org/10.3390/ijms19020404>
10. Mendias, C. L., Schwartz, A. J., Grekin, J. A., Gumucio, J. P., & Sugg, K. B. (2017). Changes in muscle fiber contractility and extracellular matrix production during skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology*, 122(3), 571–579. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00719.2016>
11. №. 29468. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Concluded at Strasbourg on 18 March 1986. (2000). *United Nations Treaty Series*, 610–610. <https://doi.org/10.18356/>

- ec490af8-en-fr.
12. Kostrub, O. O., Brusko, A. T., Blonsky, R. I., & Zayets, V. B. (2009). Model of degenerative-dystrophic tendon damage (experimental study). *Herald of orthopedics, traumatology and prosthetics*, (3), 26–28. (in Ukrainian)
 13. Abrafiikova, L. G., Petrenko, T. F., Vysekantsev, I. P., & Hryshchenko, V. I. (2010). The influence of native and cryopreserved allofibroblasts on the regeneration processes of skin ulcers in rats. *Zaporizhia Medical Journal*, 12(2), 5–8. (in Ukrainian)
 14. Lindy, S., Halme, J., Turto, H., Rokkanen, P., Vainio, K., & Wegelius, O. (1973). Collagenolytic activity in rheumatoid synovial tissue. *Clinica Chimica Acta*, 47(2), 153–157. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(73\)90310-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(73)90310-0)
 15. Frey, J. (1965). Etude d'une méthode d'exploration et du taux normal de l'hydroxyproline du serum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — General Subjects*, 111(2), 440–446. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(65\)90054-1](https://doi.org/10.1016/0304-4165(65)90054-1)
 16. Stegemann, H. J. (1952). A simple procedure for the determination of hydroxyproline in urine and bone. *Biochem Med*, 13(1), 23–30.
 17. Klyatskin, S. A., & Lifshchyts, R. I. (1989). The method of determination of glycosaminoglycans by the Orcin method in the blood of patients. *Laboratory case*, (10), 51–53. (in Ukrainian)
 18. Hudgens, J. L., Sugg, K. B., Grekin, J. A., Gumucio, J. P., Bedi, A., & Mendias, C. L. (2016). Platelet-rich plasma activates proinflammatory signaling pathways and induces oxidative stress in tendon fibroblasts. *The American Journal of Sports Medicine*, 44(8), 1931–1940. <https://doi.org/10.1177/0363546516637176>

Стаття надійшла до редакції 11.12.2023

THE INFLUENCE OF THE CULTURE OF FIBROBLASTIC CELL ELEMENTS ON THE INDICATORS OF THE METABOLISM OF CONNECTIVE TISSUE IN EXPERIMENTAL ANIMALS

S. Magomedov, Yu. V. Polyachenko, O. O. Kostrub, R. I. Blonskyi, I. A. Zasadnyuk

«Institute of Traumatology and Orthopedics of the National Academy of Sciences of Ukraine», Kyiv

✉ Sadrudin Magomedov, MD, Prof.: alexandr@magomedov.kiev.ua

✉ Yurii Polyachenko, MD, Prof.: poliach.yv@gmail.com

✉ Olexandr Kostrub, MD, Prof. in Traumatology and Orthopaedics: akostrub@ukr.net

✉ Roman Blonskyi, MD, DSci in Orthopaedics and Traumatology: drblonskiy@ukr.net

✉ Ivan Zasadnyuk, MD, PhD in Orthopaedics and Traumatology: zasadnyuk@ukr.net