

Репаративная регенерация сухожилия под влиянием секрета мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток: экспериментальное исследование

М.Д. Качалин¹, Е.Н. Борхунова¹, С.В. Полябин¹, Л.М. Михалева²,
Д.А. Арешидзе², М.А. Козлова², А.И. Довгий³

¹ ФГБОУ ВО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени академика К.И. Скрябина, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

³ ООО «Т-Хелпер Клеточные Технологии», Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Совершенствование методов лечения пациентов с травмами сухожилий является актуальной задачей биологии и медицины. Особенности строения сухожилий обуславливают их заживление с формированием рубцовой ткани при длительном сохранении очагов дистрофии. Это приводит к хронизации и рецидивированию тендинитов. Одним из способов улучшения результатов лечения при тендинитах может стать применение клеточных продуктов, в частности секрета мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК), со стандартизированной концентрацией цитокинов – провоспалительных и противовоспалительных и факторов роста. Однако репаративная регенерация сухожилий под влиянием секрета до сих пор не была изучена. Этой теме и посвящена данная статья.

Материалы и методы. Работа проведена на белых беспородных крысах (самцы, масса 120 граммов), которых подразделяли на три группы: группа I сравнения (n=35), группа II – опытная (n=35), группа III – контрольная (интактная, n=25). Животным групп I и II под изофлюрановым наркозом рассекали пяточное сухожилие, накладывали шов, после чего наносили физиологический раствор (группа I) или секретом (группа II). Рану ушивали, повторное введение препаратов проводили через неделю. Животных выводили из эксперимента через 1, 7, 14 и 60 суток. Материал изучали методами световой и трансмиссионной микроскопии. Проводили также микроскопическую морфометрию гистосрезов.

Результаты. Показано, что под влиянием секрета МСК репарация сухожилия происходит на фоне менее выраженного воспаления без развития дистрофических изменений. В ткани регенерата пучки коллагеновых волокон расположены преимущественно взаимопараллельно, количество фибробластов немного выше нормы, васкуляризация нормализуется. В контроле на протяжении всего периода исследования сохранялись признаки отека и дистрофии, регенерат представлял собой гиповаскулярную рубцовую ткань, богатую фибробластами. Толщина регенерата сухожилия в опытной группе превышала таковую в контрольной.

Заключение. Секретом МСК положительно действует на репарацию сухожилия, а выявленные структурные характеристики регенерата могут свидетельствовать о восстановлении его функциональной полноценности.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, секретом, цитокины, сухожилие, травма, репаративная регенерация

Для корреспонденции: Елена Николаевна Борхунова. E-mail: borhunova@mail.ru

Для цитирования: Качалин М.Д., Борхунова Е.Н., Полябин С.В., Михалева Л.М., Арешидзе Д.А., Козлова М.А., Довгий А.И. Репаративная регенерация сухожилия в условиях применения секрета стволовых клеток: экспериментальное исследование. Клини. эксп. морфология. 2023;12(2):77–88. DOI: 10.31088/СЕМ2023.12.2.77-88.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 06.10.2022. Получена после рецензирования 10.11.2022. Принята в печать 12.12.2022.

Reparative tendon regeneration influenced by multipotent mesenchymal stromal cell secretome: experimental study

M.D. Kachalin¹, E.N. Borkhunova¹, S.V. Pozyabin¹, L.M. Mikhaleva²,
D.A. Areshidze², M.A. Kozlova², A.I. Dovgii³

¹ K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

² Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russia

³ T-Helper Cell Technologies, LLC, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. Improving treatments for tendon injuries remains a topical issue in biology and medicine. Tendon structure is predisposed to scar formation, with significant regions of dystrophy leading to chronic and recurrent tendinitis. Stem cell regenerative therapy including mesenchymal stromal cell secretome is among promising treatments to improve patient outcomes. Standardized cytokine concentrations can be incorporated into the secretome, which may include both pro- and anti-inflammatory cytokines. This article addresses the use of stromal cell secretome for tendon injury regeneration, which is poorly studied.

Materials and methods. The study included 95 white outbred rats (males, weight 120 g), which were divided into three groups: Group I comparison (n=35), Group II experimental (n=35), and Group III control (n=25). Animals in Groups I and II were anesthetized with isoflurane and their calcaneal tendons were dissected and sutured. Animals in Group I were treated with saline solution, whereas Group II received stromal cell secretome. The wounds were subsequently sutured. One week after the manipulation, the animals received the second treatment around the tendon. The animals were withdrawn from the experiment on days 1, 7, 14, and 60. We analyzed the samples using light microscopy with morphometry and transmission electron microscopy.

Results. Treating tendons with stromal cell secretome (Group II) is accompanied by less pronounced inflammation and shows no dystrophic changes. The collagen bundles in the regenerate are parallel to each other, with vasculature being normalized and the number of fibroblasts having a slight increase. The control samples, however, showed inflammation, dystrophy, and scarring with hypovascularization of the regenerate. Moreover, the total fibroblast count in the tissue of the control samples elevated significantly. The regenerate in Group II was slightly thicker than in Group III, while in Group I, the regenerate was thinner than in Group III.

Conclusion. Mesenchymal stromal cell secretome greatly contributes to tendon healing. Microscopic tendon regenerate structure is similar to that of the intact sample, suggesting its functional recovery.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, secretome, cytokines, tendon, trauma, reparative regeneration

Corresponding author: Elena N. Borkhunova. E-mail: borhunova@mail.ru

For citation: Kachalin M.D., Borkhunova E.N., Pozyabin S.V., Mikhaleva L.M., Areshidze D.A., Kozlova M.A., Dovgii A.I. Reparative tendon regeneration influenced by multipotent mesenchymal stromal cell secretome: experimental study. *Clin. exp. morphology*. 2023;12(2):77–88 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.77-88.

Funding. The study was carried out within the framework of state budget funding.

Received 06.10.2022. **Received in revised form** 10.11.2022. **Accepted** 12.12.2022.

Введение

Совершенствование методов лечения пациентов с повреждениями сухожилий остается актуальной задачей биологии и медицины. При тендинитах регенерация обычно завершается формированием в толще сухожилия рубцов и очагов дистрофических изменений, которые в дальнейшем становятся местами наименьшей устойчивости. При функциональной нагрузке на сухожилия в них вновь возникают микроразрывы, что обуславливает хроническое течение тендинитов с перманентным рецидивированием [1–5]. Консервативная терапия при тендинитах, как правило, недостаточно результативна, а хирургическое лечение, в том числе с применением ауто- и аллотрансплантатов, приводит к рубцовым изменениям сухожилия [4–6].

Одним из перспективных методов лечения при тендинитах является использование клеточных продуктов [7–17]. На наш взгляд, для оптимизации репаративной регенерации сухожилий эффективным может оказаться применение секрета мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК), содержащего комплекс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и факторов роста и апробированного в ветеринарной практике для лечения язв роговицы различной этиологии и кожных ран [18–20].

Цель исследования – на экспериментальной модели полного разрыва пяточного сухожилия изучить особен-

ности течения репаративной регенерации под влиянием секрета МСК.

Материалы и методы

Работа проведена на белых беспородных крысах (самцы, масса 120 граммов), которых разделили на три группы: группа I – сравнения (n=35), группа II – опытная (n=35), группа III – контрольная (интактная, n=25). Под общей анестезией (изофлюран) в группах I и II осуществили оперативный доступ к пяточному сухожилию, которое после выделения рассекли скальпелем в поперечном направлении, моделируя тотальный разрыв. После тенорафии с помощью сухожильного шва Ланге (шовный материал полигликолид 6/0), полость раны орошали физиологическим раствором в группе I и секретом МСК в группе II (0,5 мл препарата, экспозиция 2 минуты). Секретом МСК (линия клеток hb-MSK, регистрационный номер Н-154, депонирована во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов), использованный в исследовании, содержался в препарате Репарин-Хелпер отечественного производства («Т-Хелпер», Россия), в его составе – комплекс цитокинов (IL-6, IP-10, IL-10, GRO/КС, TGF- β , IFN- γ , MCP-1, VEGF) [20]. Затем раны ушивали. Повторное введение препарата осуществляли паратенониально через 7 суток после операции (0,2 мл).

Через 1, 7, 14 и 60 суток крыс выводили из эксперимента путем передозировки изофлюрана и брали материал для микроскопических исследований. В группах I и II на 1-е сутки материал взят от пяти животных, на 7-е, 14-е и 60-е сутки – от десяти животных. Для гистологических исследований образцы сухожилья фиксировали в 10% растворе формалина, заливали в парафин по общепринятой методике и после окрашивания гематоксилином и эозином и по ван Гизону изучали с помощью световой микроскопии и микроскопической морфометрии. Оценивали общую морфологическую картину, а также определяли толщину регенерата сухожилия, толщину пучков коллагеновых волокон регенерата, количество фибробластов и гемокapилляров в стандартном поле зрения (ПЗ) при $\times 400$. Показатели групп сравнивали с нормативными показателями интактных (группа III). Исследования проводили с помощью микроскопа Jenamed-2 (Carl Zeiss, Германия), совмещенного с программой цифрового анализа микроскопического изображения ImageScore 4,0 (Leica Biosystems, Германия). В каждой группе для каждого срока готовили 10 срезов с одного объекта (тотальный продольный срез сухожилья), в структуре регенерата выявляли типичную картину, преобладающую во всех ПЗ, подсчет проводили не менее чем в 10 полях зрения. Цифровой материал подвергали статистической обработке с помощью программы Statistica 8.1 (Statsoft, США). Для выявления отличительных количественных характеристик регенерата в группах I и II на разных этапах репарации исполь-

зовали критерий Краскела–Уоллеса, различия считали значимыми при значении $p \leq 0,05$.

Для исследований методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) образцы сухожилья размером 2 мм³ фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (pH 7,4), дофиксировали в 1% растворе четырехокиси осмия (OsO₄), обезвоживали в этаноле по общепринятой схеме, в процессе обезвоживания контрастировали 1% уранилацетатом на 70% этаноле и проводили заливку в смесь эпон–аралдит по стандартной методике. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-III (LKB Produkter, Швеция) и дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу, после чего изучали с помощью микроскопа JEM-100CX (JEOL, Япония). Фотофиксация препаратов проводилась с помощью камеры Gatan ES500W Erlangshen, Model 782, (Gatan Inc., США). При исследовании осуществляли оценку морфологической картины образцов. Все манипуляции с лабораторными животными проводили согласно директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Работа одобрена комиссией по биоэтике НИИ ЭДнТО НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (протокол № 109 от 26.09.2022).

Результаты

Результаты гистологических исследований

В группе I через 1 сутки после операции наблюдали некроз ткани сухожилья в области разреза и наложения шва, перифокально в эпитеноне, пери- и эндотеноне отмечали отек и обильную нейтрофильную инфильтрацию с участием макрофагов (рис. 1 А). Паравазально и в толще сухожилья визуализировали многочисленные тучные клетки с признаками дегрануляции. Через 7 суток в структуре регенерата выявлялись тонкие пучки коллагеновых волокон, среди которых располагались многочисленные крупные фибробласты (рис. 1 В), а также большой объем белой жировой ткани, что может быть реактивным изменением в ответ на травму. В регенерате наблюдали многочисленные гемокapилляры и тучные клетки, многие из которых находились в состоянии дегрануляции. Сохранялись умеренная диффузная нейтрофильно-макрофагальная инфильтрация и очаговые дистрофические изменения в виде фибриноидного набухания. Через 14 суток толщина и плотность расположения пучков коллагеновых волокон возрастали, они имели волнистую конфигурацию и переменное расположение: от взаимопараллельного до разнонаправленного. Объем белой жировой ткани уменьшался, она располагалась в межпучковой соединительной ткани и имела признаки фиброза. В богатой фибробластами и гемокapиллярами ткани регенерата (рис. 1 С) по-прежнему наблюдали лимфоцитарно-макрофагальный инфильтрат и тучные клетки, а также очаги деструк-

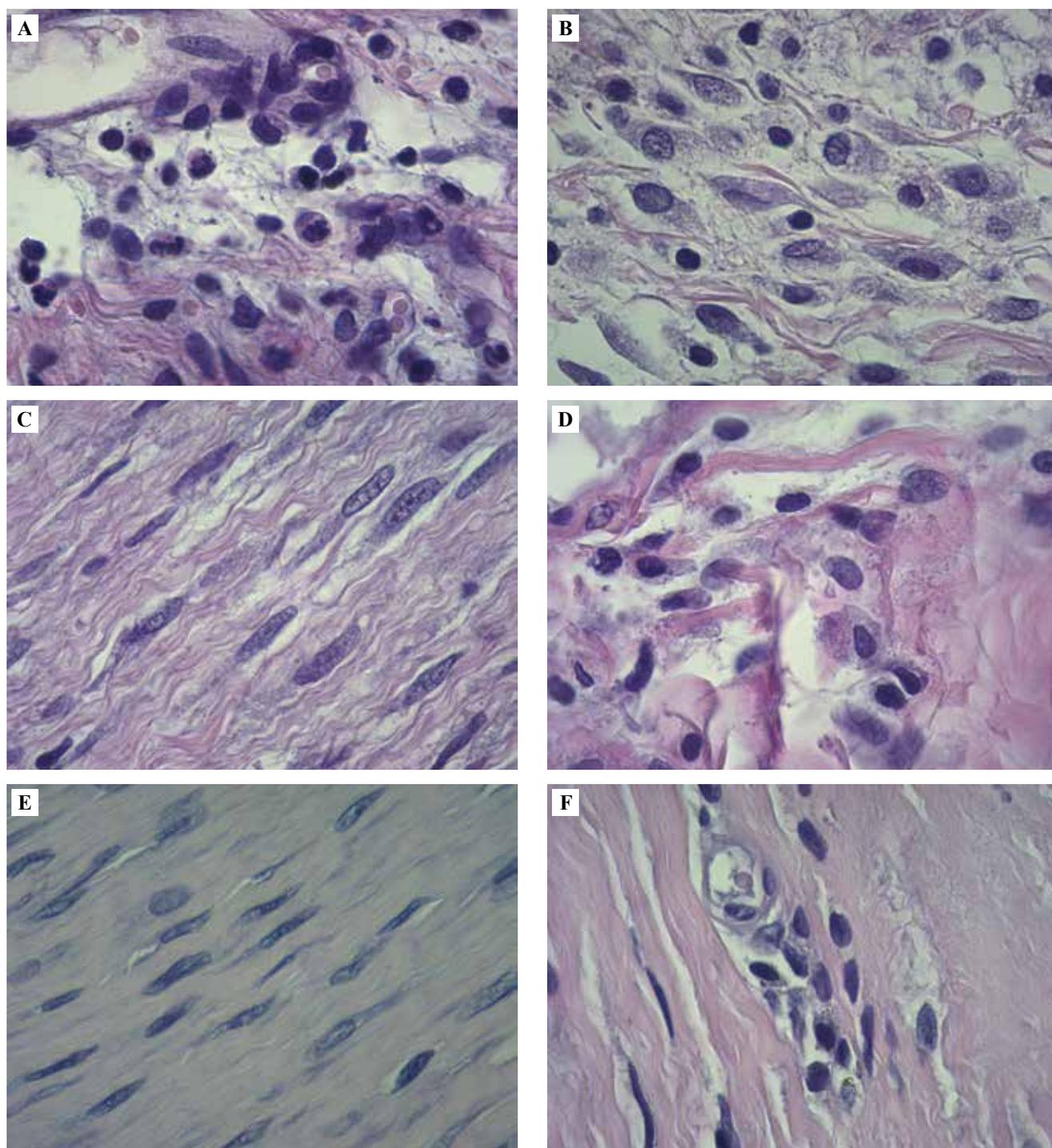


Рис. 1. Структура регенерата сухожилия в группе I.

А – 1 сутки: нейтрофильно-макрофагальный инфильтрат и отек в перитенонии; В – 7 суток: фибробласты, макрофаги и тонкие пучки коллагеновых волокон в ткани регенерата; С – 14 суток: пучки коллагеновых волокон волнистой конфигурации, между ними находятся фибробласты; D – 14 суток: очаг фибриноидного набухания с признаками макрофагальной резорбции; E – 60 суток: рубцовая ткань с многочисленными фиброцитами, плотно расположенные пучки коллагеновых волокон имеют волнистую или прямолинейную архитектуру; F – 60 суток: очаг макрофагальной резорбции детрита. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 1000$

Fig. 1. Tendon regenerate structure in Group I.

Structure of a tendon regenerate in Group I. A – day 1: infiltrate consisting of neutrophils and macrophages, edema in the peritendineum; B – day 7: fibroblasts, macrophages, and thin bundles of collagen fibers in the regenerate; C – day 14: wavy bundles of collagen fibers among fibroblasts; D – day 14: focus of fibrinoid swelling with signs of macrophage resorption; E – day 60: scar tissue with numerous fibrocytes, densely located bundles of collagen fibers with wavy or rectilinear architecture; F – day 60: macrophages resorbing the detritus. H&E stain. $\times 1,000$

тивных изменений с признаками макрофагальной резорбции (рис. 1 D). Через 60 суток регенерат имел пучковое строение. В его структуре преобладали области с плотной упаковкой пучков коллагеновых волокон прямолинейной или волнистой архитектоники, богатые фиброцитами (рис. 1 E) и отличающиеся неодинаковым расположением (параллельное, косое), что характерно для рубцовых изменений сухожилия. Между пучками была расположена соединительная ткань с кровеносными сосудами капиллярного и венозного типа, имеющая признаки фиброза и содержащая умеренный макрофагально-лимфоцитарный инфильтрат. Наряду с этим в регенерате сохранялись очаги мукоидного и фибриноидного набухания с макрофагальной инфильтрацией (рис. 1 F). Примечательно, что в этот срок ткань регенерата становилась гиповаскулярной.

В группе II через 1 сутки инфильтрат был обильнее, чем в группе I. Обращает на себя внимание, что в эпителии и поверхностных слоях сухожилия он состоял из нейтрофилов и макрофагов, а в толще сухожилия главным образом из макрофагов и лимфоцитов (рис. 2 A). Это может указывать на локальное более раннее завершение нейтрофильной реакции и начало процесса резорбции детрита в толще сухожилия. Через 7 суток в структуре регенерата наблюдали оформленные пучки коллагеновых волокон, между которыми находилась межпучковая соединительная ткань; она содержала меньше адипоцитов по сравнению с образцами группы II. В очагах некроза среди деструктивно измененных волокон располагались крупные молодые фибробласты и гемокapилляры (рис. 2 B). При этом тонкие коллагеновые волокна регенерата располагались между «старых», предсуществующих пучков поврежденного сухожилия, что позволяет предположить возможность векторного

синтеза межклеточного вещества регенерата на основе исходных коллагеновых конструкций. Вне областей некроза регенерат содержал крупные отростчатые фибробласты и тонкие, хорошо структурированные пучки коллагеновых волокон со взаимопараллельным расположением.

Через 14 суток наблюдали регенерат, сформированный фиброзной тканью пучкового строения. Пучки коллагеновых волокон большей толщины, чем в контроле, отличались плотным расположением и выраженной волнистостью конфигурации. Между ними расположены крупные отростчатые фибробласты и фиброциты (рис. 2 C). Пучки коллагеновых волокон разделялись прослойками соединительной ткани с кровеносными сосудами и многочисленными сидерофагами (рис. 2 D). Они были тоньше, чем в контрольных образцах, и содержали лишь единичные адипоциты. Паравазально наблюдалась умеренная лимфоидно-макрофагальная инфильтрация. Через 60 суток регенерат сохранял пучковое строение. Пучки коллагеновых волокон толстые, прямой или волнистой конфигурации, располагались плотно и в основном взаимопараллельно (рис. 2 E). Между ними видны фиброциты, количество которых было меньше, чем в группе I. В то же время степень васкуляризации регенерата выше, чем в группе I. В толще регенерата встречались области с массовым апоптозом фиброцитов (рис. 2 F) и очаговой макрофагальной резорбцией, что наряду с умеренной макрофагальной инфильтрацией межпучковой соединительной ткани может свидетельствовать о ремоделировании регенерата, которое выражено в большей степени, чем в контроле. Динамика толщины регенерата и морфометрические показатели его ткани представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 | Table 1

Динамика толщины регенерата сухожилия (мкм), Me (Q₁;Q₃) | Tendon regenerate thickness over time (μm), Me (Q₁;Q₃)

Срок эксперимента Experiment day	Группы Groups		
	группа I group I	группа II group II	группа III (нормативные показатели), n=25 group III (reference range), n=25
7 суток Day 7 n=10	1070 (1063; 1079)	1430* (1419; 1442)	725 (695; 734)
14 суток Day 14 n=10	889 (878; 897)	1240* (1231; 1249)	
60 суток Day 60 n=10	582 (572; 598)	743* (732; 756)	

* Статистически значимые отличия группы II от группы I и группы III (p≤0,05) | Statistically significant differences between group II and groups I and III (p≤0.05)

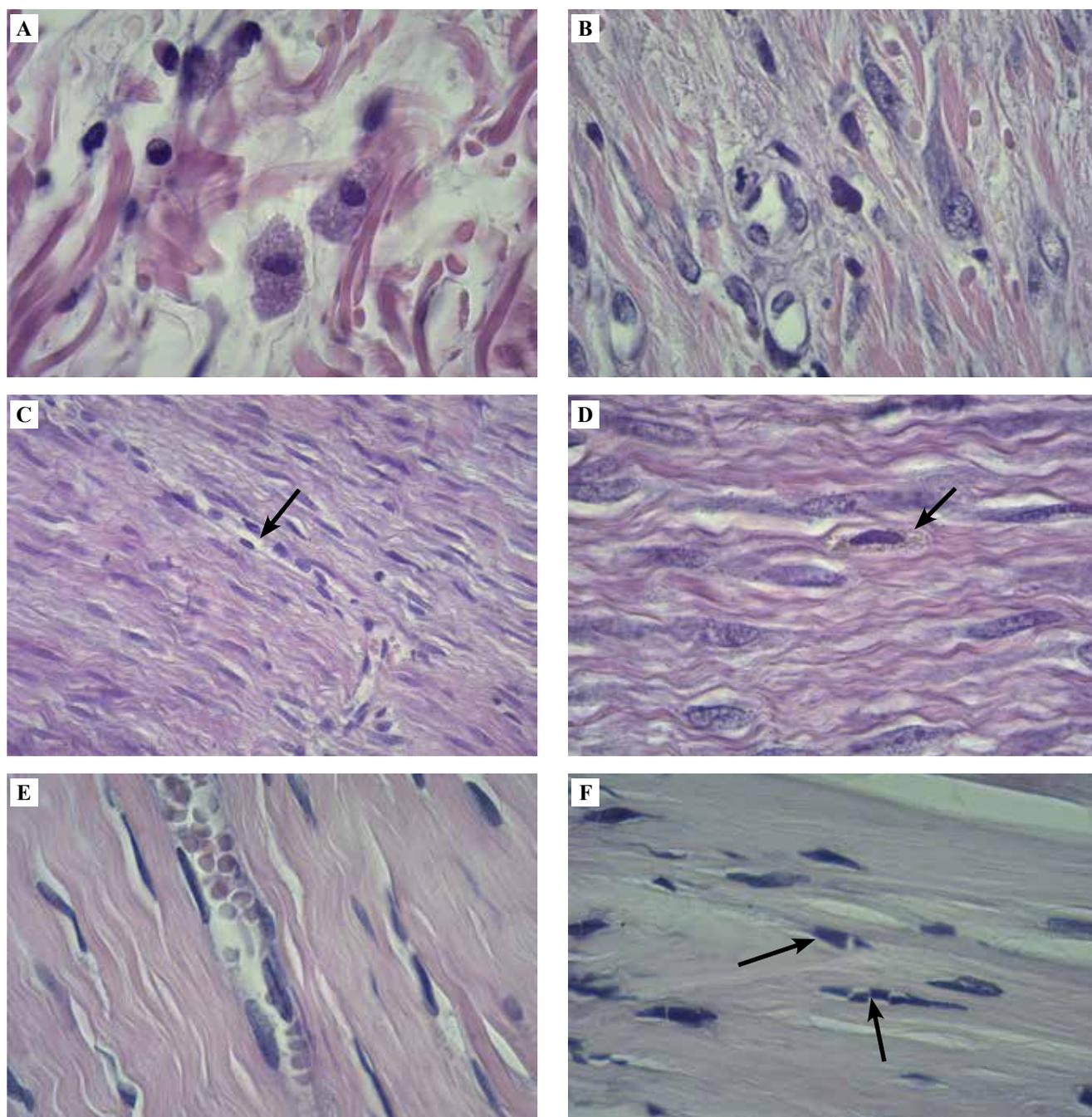


Рис. 2. Структура регенерата сухожилия в группе II.

А – 1 сутки: лимфоцитарно-макрофагальный инфильтрат и отек в перитенонии; В – 7 суток: кровеносные сосуды, макрофаги и крупные фибробласты находятся между «старыми» пучками коллагеновых волокон; С – 14 суток: пучки коллагеновых волокон плотно упакованы, имеют волнистую конфигурацию, среди них видны многочисленные фибробласты и гемокapилляр (стрелка); D – 14 суток: фиброциты и фибробласты фиброзной ткани среди пучков коллагеновых волокон, стрелкой показан сидерофаг; E – 60 суток: пучки коллагеновых волокон регенерата хорошо структурированы, волнистой конфигурации, плотно расположены, между ними находятся фиброциты, виден кровеносный сосуд венозного типа; F – 60 суток: область регенерата с многочисленными фиброцитами в состоянии апоптоза (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином. А, В, D–F – $\times 1000$. С – $\times 400$

Fig. 2. Tendon regenerate structure in Group II.

A – day 1: infiltrate consisting of lymphocytes and macrophages, edema in the peritendineum; B – day 7: blood vessels, macrophages, and large fibroblasts located between the “old” bundles of collagen fibers; C – day 14: the bundles of collagen fibers are tightly packed and of a wavy configuration, with numerous fibroblasts and blood capillaries being among the bundles (arrow); D – day 14: fibrocytes and fibroblasts among bundles of collagen fibers, a siderophage (arrow); E – day 60: well-structured and tightly located bundles of regenerate collagen fibers with wavy configuration, with fibrocytes being among them, a venous-type blood vessel in the center; F – day 60: regenerate region with numerous apoptotic fibrocytes (arrows). H&E stain. A, B, D–F – $\times 1,000$. C – $\times 400$

Таблица 2 | Table 2

Сравнительная характеристика регенератов сухожилия по динамике показателей толщины пучков коллагеновых волокон первого и второго порядка (мкм), количества фибробластов и гемокapилляров (в поле зрения при $\times 400$), Me (Q₁;Q₃) | Comparison of tendon regenerates with primary and secondary collagen fiber bundle thickness (μm) and the number of fibroblasts and blood capillaries (in the field of view at $\times 400$), Me (Q₁÷Q₃)

Срок эксперимента и группы Experiment days	Показатели Indicators			
	толщина пучков коллагеновых волокон первого порядка, мкм Primary collagen fiber bundle thickness, μm	толщина пучков коллагеновых волокон второго порядка, мкм Secondary collagen fiber bundle thickness, μm	количество фибробластов Number of fibroblasts	количество гемокapилляров Number of hemocapillaries
7 суток Day 7				
Группа I, n=10 Group I, n=10	2,5 (2,2; 2,7)	Не организованы Disorganized	47 (41; 52)	10 (9;12)
Группа II, n=10 Group II, n=10	2,3 (2,0; 2,5)	Не организованы Disorganized	68* (65; 72)	11 (10;12)
14 суток Day 14				
Группа I, n=10 Group I, n=10	4,8 (4,2; 5,0)	124 (110; 134)	70 (65; 74)	8 (7;10)
Группа II, n=10 Group II, n=10	4,1 (2,5; 4,3)	126 (112; 136)	52* (46; 55)	6 (4;8)
60 суток Day 60				
Группа I, n=10 Group I, n=10	5,1 (4,8; 5,3)	172* (157; 181)	64 (58; 67)	3*(1;4)
Группа II, n=10 Group II, n=10	4,9 (4,8; 5,1)	123 (117; 131)	44* (40; 48)	6 (4;8)
Группа III (нормативные показатели), n=25 Group III (reference range), n=25	6,2 (5,9; 6,4)	106 (99; 109)	36 (34; 40)	6 (4;8)

* Статистически значимые отличия группы II от группы I и группы III ($p \leq 0,05$) | Statistically significant differences between group II and groups I and III ($p \leq 0,5$)

Результаты исследований методом трансмиссионной электронной микроскопии

В группе I через 1 сутки в области вмешательства наблюдали детрит и выраженный отек межклеточного вещества, в коллагеновых фибриллах были видны признаки фибриноидного набухания (рис. 3 А). Через 7 суток в области заживления на фоне сохранения отека и очагов фибриноидного набухания наблюдали активированные фибробласты и вновь образованные коллагеновые фибриллы неупорядоченной архитектоники (рис. 3 В). Через 14 суток в регенерате, богатом фибробластами, гистиоцитами и гемокapиллярами, часть

вновь сформированных коллагеновых фибрилл уже имела признаки фибриноидного набухания (рис. 3 С). Через 60 суток в ткани регенерата сохранялись признаки отека эндотенона, незначительный отек межфибриллярных пространств. Структура коллагеновых фибрилл была сохранена, они имели разнонаправленное расположение и плотную упаковку (рис. 3 D), что характерно для рубцовых изменений. Дистрофические изменения определяли лишь очагово.

В группе II через 1 сутки наблюдались неупорядоченное расположение поврежденных коллагеновых фибрилл, а также признаки умеренно выраженного

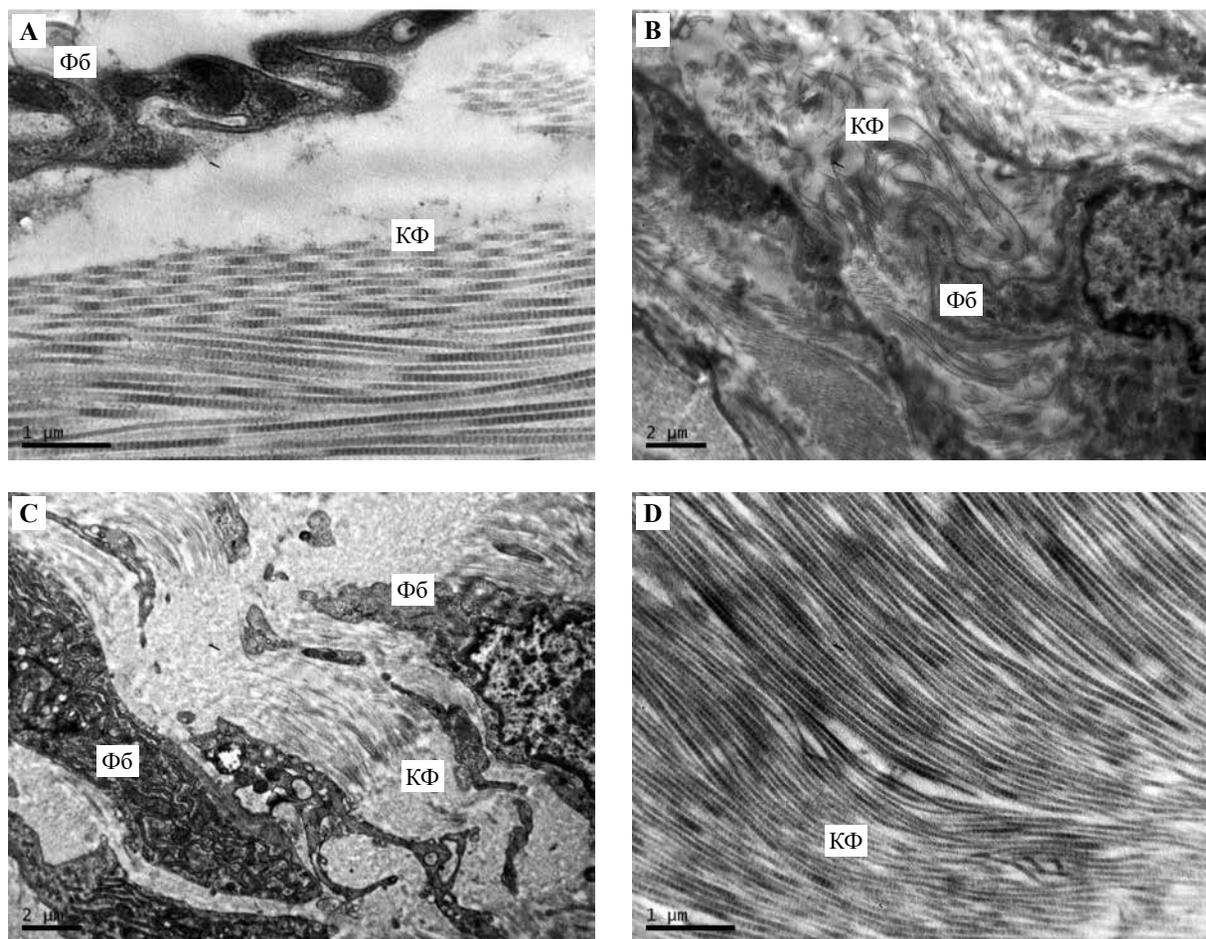


Рис. 3. Динамика ультраструктуры регенерата сухожилия в группе I.

А – 1 сутки: отек межклеточного вещества, многие коллагеновые фибриллы (КФ) не имеют поперечной исчерченности; В – 7 суток: фибробласт (Фб) и разнонаправленные, закрученные коллагеновые фибриллы (КФ) регенерата; С – 14 суток: фибробласты (Фб) имеют признаки высокой синтетической активности, между ними видны коллагеновые фибриллы; D – плотно расположенные коллагеновые фибриллы, видны признаки межфибриллярного отека. ТЭМ. А – $\times 20\,000$, В–D – $\times 14\,000$

Fig. 3. Ultrastructure of the tendon regenerates in Group I over time.

А – day 1: swollen intercellular substance, many collagen fibrils (КФ) do not have transverse striation; В – day 7: fibroblast (Фб) and divergent whirled collagen fibrils (КФ) of the regenerate; С – day 14: fibroblasts (Фб) of high synthetic activity, with collagen fibrils (КФ) being among them; D – densely located collagen fibrils (КФ), interfibrillar edema. TEM, А – $\times 20,000$, В–D – $\times 14,000$

мукоидного набухания основного вещества ткани (рис. 4 А), которое сохранялось на 7-е и 14-е сутки. Через 7 суток в ткани регенерата выявляли умеренную пролиферацию фибробластов. Синтезируемые ими коллагеновые фибриллы обладали типичной поперечной исчерченностью, имели взаимопараллельное расположение и волнистую конфигурацию (рис. 4 В), к 14-м суткам упорядоченность и плотность их расположения возрастали (рис. 4 С). Через 60 суток в регенерате отмечали волнистую деформацию коллагеновых фибрилл и формируемых ими волокон. Отек основного вещества и межфибриллярных пространств был умеренным и выраженным в меньшей степени, чем в группе I. При этом коллагеновые фибриллы имели типичную поперечную исчерченность, были хорошо структурированы и ориентированы взаимопараллельно (рис. 4 D).

Результаты микроморфометрических исследований

Результаты микроморфометрических исследований регенератов сухожилия представлены в таблицах 1 и 2.

При оценке межгрупповых отличий показано, что в процессе репарации статистически значимые различия толщины регенерата появлялись между группами I и II на 7-е сутки и сохранялись на всех сроках эксперимента. По данному показателю образцы группы II на 7-е, 14-е и 60-е сутки превосходили образцы группы II и были несколько больше, чем в группе III. Последний факт может быть связан с рубцовыми изменениями сухожилия и околосухожильных тканей.

По показателю толщины пучков коллагеновых волокон первого порядка статистически значимых отличий между группами I и II не имелось, однако на всех

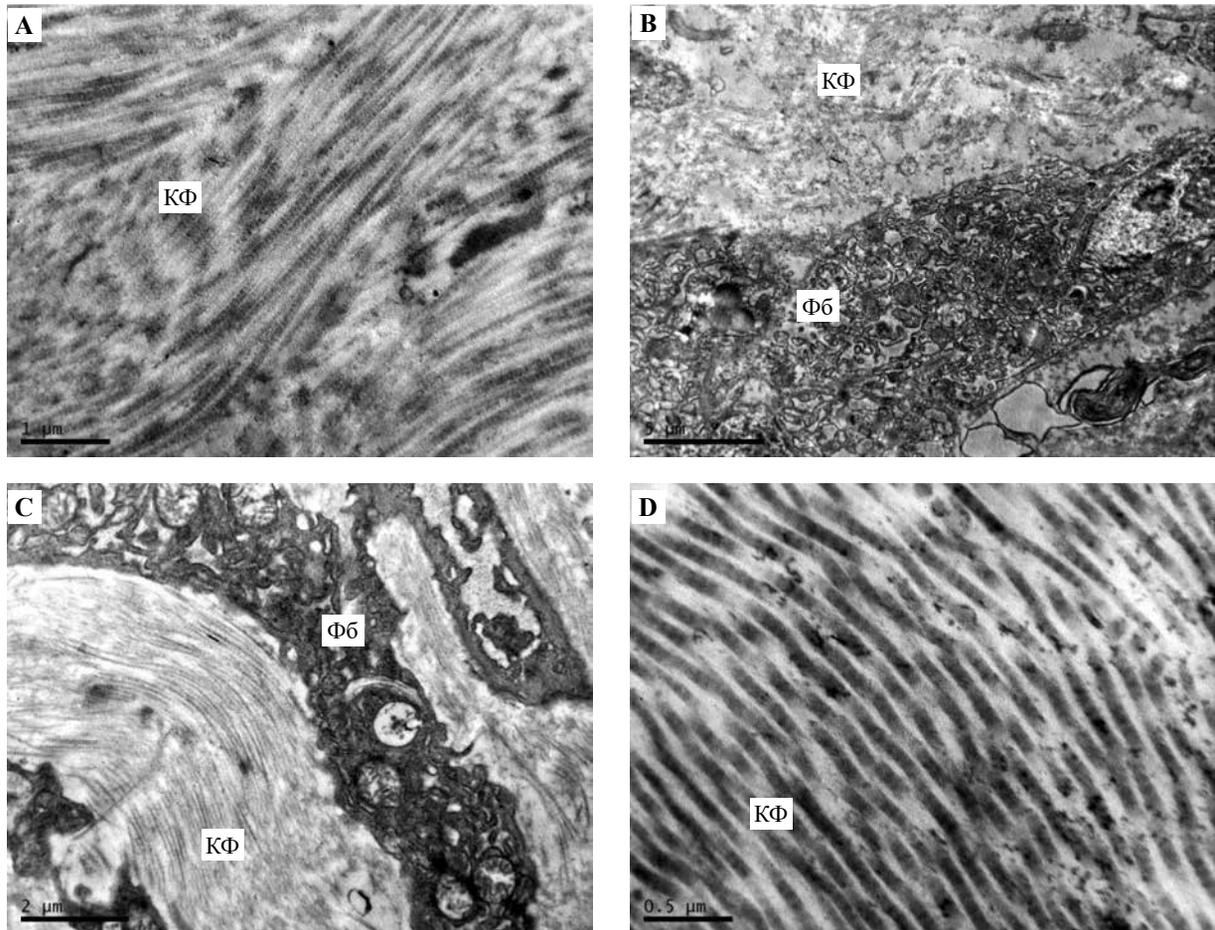


Рис. 4. Динамика ультраструктуры регенерата сухожилия в группе II.

А – 1 сутки: отек межклеточного вещества, поперечная исчерченность коллагеновых фибрилл (КФ) сохранена; В – 7 суток: незначительный отек межфибриллярного пространства, коллагеновые фибриллы (КФ) имеют волнистую конфигурацию, взаимопараллельное расположение и типичную поперечную исчерченность; С – 14 суток: коллагеновые фибриллы (КФ) хорошо структурированы, имеют упорядоченное расположение, рядом с ними виден фибробласт (Фб); D – плотно расположенные коллагеновые фибриллы (КФ) волнистой конфигурации, видны признаки межфибриллярного отека. ТЭМ. А – $\times 20\,000$, В – $\times 8\,000$, С – $\times 14\,000$, D – $\times 40\,000$

Fig. 4. Ultrastructure of the tendon regenerates in Group II over time.

A – day 1: intercellular edema, preserved cross striation of the collagen fibrils (КФ); B – day 7: minor swelling of the interfibrillar space, parallel to each other collagen fibrils (КФ) with a wavy configuration, and a typical cross striation; C – day 14: well-structured collagen fibrils (КФ) with an ordered arrangement, fibroblast (Фб) is next to them; D – densely located collagen fibrils (КФ) with wavy configuration, interfibrillar edema. TEM. A – $\times 20,000$, B – $\times 8,000$, C – $\times 14,000$, D – $\times 40,000$

сроках эксперимента этот показатель уступал таковому в группе III, не достигая контрольных значений даже на 60-е сутки опыта. По показателю толщины пучков коллагеновых волокон второго порядка различия между группами I и II на 14-е сутки не установлены, но по этому показателю обе группы превосходили группу III. На 60-е сутки в группе I толщина пучков коллагеновых волокон второго порядка еще более возрастала, в группе II оставалась без изменений, но в обеих группах значения этого показателя превосходили таковые в группе III. Это может быть связано с рубцовыми изменениями, выраженными в большей степени в группе I. Количество фибробластов в ткани регенерата имело статистически значимые отличия между группами на всех сроках эксперимента, при этом в группах I и II оно было

больше, чем в группе III, и не достигало нормальных значений к 60-м суткам. При этом на 7-е сутки образцы группы II превосходили образцы группы I по данному показателю, а на 14-е и 60-е сутки уступали им. Такая картина может быть связана с ранним усилением пролиферативной и синтетической активности клеток фибробластического дифферона, а затем с более ранним началом ремоделирования в результате действия секрета. По показателю количества гемокapилляров статистически значимые отличия установлены между группами I и II на 60-е сутки эксперимента: в эти сроки опытные образцы не только превосходят контрольные, но и соответствуют нормальным значениям, что указывает на лучшее кровоснабжение ткани регенерата, сформированного под влиянием секрета МСК.

Обсуждение

Ряд авторов сообщает о положительных результатах лечения тендинитов при использовании стромально-васкулярной фракции и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток [7–17], которые обладают способностью стимулировать собственные прогениторные клетки ткани сухожилия, уменьшают выраженность экссудации и стимулируют формирование регенерата с упорядоченным расположением пучков коллагеновых волокон. Применяются и сами прогениторные клетки сухожилий, получаемые из эндотенония и перитенония [7], используется методика 3D культивирования клеток на трехмерных матрицах [12]. Тем не менее в этих исследованиях недостаточно полно осуществлен морфологический контроль, а результаты не всегда стандартны, что не позволяет выработать протокол применения клеточных продуктов в клинической практике.

Проведенное нами исследование влияния секрета МСК на течение репаративной регенерации сухожилия показало, что под влиянием секрета с первых суток после травмы и на всем протяжении эксперимента воспалительный отек и деструктивные изменения ткани выражены в меньшей степени, чем в контроле. На ультраструктурном уровне установлено, что в опытной группе в отличие от контрольной отсутствовали признаки фибриноидного набухания и выраженных некротических изменений, что, на наш взгляд, представляется важным фактором полноценного заживления. При самостоятельном заживлении именно эти очаги дистрофии являются одной из причин хронизации тендинитов и их перманентного рецидивирования. Резорбция детрита происходит раньше, как и формирование регенерата пучкового строения: оно отмечено уже на 7-е сутки эксперимента, тогда как в контроле наблюдается на 14-е сутки. В ткани регенерата в опытной группе на 7-е сутки пучки коллагеновых волокон были лучше структурированы и приобрели взаимопараллельное расположение, в то время как в контроле они оказались не только тоньше, но и перемежались в структуре регенерата с белой жировой тканью. В дальнейшем с 14-х суток отмечались признаки ремоделирования регенерата: апоптоз фиброцитов и фибробластов, который выражен в большей степени, чем в контрольных образцах, макрофагальная инфильтрация регенерата, изменение фиброархитектоники. К 60-м суткам в опытных образцах наблюдались уплотнение расположения и утолщение пучков коллагеновых волокон при их взаимопараллельном расположении, уменьшение количества фибробластов при нормализации васкуляризации. В контрольных образцах отмечали как взаимопараллельное, так и разнонаправленное расположение пучков коллагеновых волокон в фиброзной ткани регенерата, не соответствующее биомеханической оси конечности. Наряду с уменьшением общей толщины регенерата этот фактор, несомненно, обуславливает снижение прочностных и упруго-деформативных характеристик сухожилия, что является морфологической

основой для его повторных травм. Кроме того, ткань регенерата в контрольных образцах была гиповаскулярной, при этом в ней сохранялось большое количество фиброцитов и фибробластов, что в дальнейшем может усугубить рубцовые изменения ткани сухожилия. Можно полагать, что в опытной группе более раннее ремоделирование регенерата, его структурированность и нормализация васкуляризации обусловлены действием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в секрете МСК, а также факторов роста, в частности фактора роста эндотелия.

Заключение

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что в условиях применения секрета мезенхимальных стромальных клеток репаративная регенерация сухожилия протекает, в отличие от контроля, на фоне менее выраженных воспалительного отека, трофических нарушений и дистрофических и некротических изменений. Ремоделирование регенерата начинается раньше, чем в контроле, причем он приобретает свойственное сухожилию пучковое строение. Наряду с меньшей выраженностью рубцовых изменений и нормализацией васкуляризации это может быть залогом формирования полноценного в структурном и функциональном отношении регенерата.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – М.Д. Качалин, Е.Н. Борхунова, С.В. Позыбин, Л.М. Михалева, Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова, А.И. Довгий.

Сбор и обработка материала – М.Д. Качалин, Е.Н. Борхунова, С.В. Позыбин, Л.М. Михалева, Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова, А.И. Довгий.

Написание текста – Е.Н. Борхунова, М.Д. Качалин.

Редактирование – М.Д. Качалин, Е.Н. Борхунова, С.В. Позыбин, Л.М. Михалева, Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова, А.И. Довгий.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – M.D. Kachalin, E.N. Borkhunova, S.V. Pozyabin, L.M. Mikhaleva, D.A. Areshidze, M.A. Kozlova, A.I. Dovgii.

Collected the data and performed the analysis – M.D. Kachalin, E.N. Borkhunova, S.V. Pozyabin, L.M. Mikhaleva, D.A. Areshidze, M.A. Kozlova, A.I. Dovgii.

Wrote the paper – E.N. Borkhunova, M.D. Kachalin.

Edited the manuscript – M.D. Kachalin, E.N. Borkhunova, S.V. Pozyabin, L.M. Mikhaleva, D.A. Areshidze, M.A. Kozlova, A.I. Dovgii.

Конфликт интересов. Андрей Игоревич Довгий – генеральный директор ООО «Т-Хелпер Клеточные Технологии». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. Andrew I. Dovgii – General Director, LLC “T-Helper Cell Technologies”. Other authors declare that they have no competing interests.

Литература/References

1. Борхунова Е.Н. Морфологические изменения в ткани сухожилия поверхностного сгибателя пальца у лошадей при тендинитах. Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2021;3:6–13. DOI: 10.36871/vet.zoo.bio.202103001.

- Borkhunova E.N.* Morphological changes in the tendon tissue of the superficial flexor of the finger in horses with tendinitis. *Veterinary Medicine, Zootechnics and Biotechnology*. 2021;3:6–13 (In Russ.). DOI: 10.36871/vet.zoo.bio.202103001.
2. *Andarawis-Puri N, Flatow EL, Soslowsky LJ.* Tendon basic science: Development, repair, regeneration, and healing. *J Orthop Res*. 2015;33(6):780–4. DOI: 10.1016/j.surge.2017.04.004.
 3. *D'Addona A, Maffulli N, Formisano S, Rosa D.* Inflammation in tendinopathy. *Surgeon*. 2017;15(5): 297–302. DOI: 10.1016/j.surge.2017.04.004.
 4. *Samora JB, Klinefelter RD.* Flexor tendon reconstruction. *J Am Acad Orthop Surg*. 2016;24(1):28–36. DOI: 10.5435/JAAOS-D-14-00195.
 5. *Пономаренко Н.С., Куклин И.А., Монастырев В.В., Михайлов И.Н., Рудаков А.Н., Бубнов А.С. и др.* Сравнение результатов хирургического лечения пациентов с повреждением пяточного сухожилия при диастазе II и III степени по Myerson с использованием сухожилия подошвенной мышцы. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018;3(3):170–175. DOI: 10.29413/ABS.2018-3.3.32.
Ponomarenko NS, Kuklin IA, Monastirev VV, Mikhaylov IN, Rudakov AN, Bubnov AS et al. Comparison of the results of surgical treatment of patients with Achilles tendon injury at Myerson stage II and III diastasis using plantar muscle flexor tendon. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018;3(3):170–175 (In Russ.). DOI: 10.29413/ABS.2018-3.3.32.
 6. *Gillespie RJ, Knapik DM, Akkus O.* Biologic and synthetic grafts in the reconstruction of large to massive rotator cuff tears. *J Am Acad Orthop Surg*. 2016;24(12): 823–8. DOI: 10.5435/JAAOS-D-15-00229.
 7. *Walia B, Huang AH.* Tendon stem progenitor cells: Understanding the biology to inform therapeutic strategies for tendon repair. *J Orthop Res*. 2019;37(6):1270–80. DOI: 10.1002/jor.24156.
 8. *Costa-Almeida R, Calejo I, Gomes ME.* Mesenchymal stem cells empowering tendon regenerative therapies. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12):3002. DOI: 10.3390/ijms20123002.
 9. *Schneider M, Angele P, Järvinen TAH, Docheva D.* Rescue plan for Achilles: Therapeutics steering the fate and functions of stem cells in tendon wound healing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;129:352–75. DOI: 10.1016/j.addr.2017.12.016.
 10. *Al-Ani MKh, Xu K, Sun Y, Pan L, Xu Z, Yang L.* Study of bone marrow mesenchymal and tendon-derived stem cells transplantation on the regenerating effect of Achilles tendon ruptures in rats. *Stem Cells Int*. 2015;2015:984146. DOI: 10.1155/2015/984146.
 11. *MacLean S, Khan WS, Malik AA, Snow M, Anand S.* Tendon regeneration and repair with stem cells. *Stem Cells Int*. 2012;2012:316281. DOI: 10.1155/2012/316281.
 12. *Дремлина Н.Н., Трухан И.С., Шурыгина И.А.* Клеточные технологии в травматологии: от клетки до клеточной инженерии. *Acta Biomedica Scientifica*. 2020;5(6):66–76. DOI: 10.29413/ABS.2020-5.6.8.
Dremina NN, Trukhan IS, Shurygina IA. Cellular Technologies in Traumatology: from Cells to Tissue Engineering. *Acta Biomedica Scientifica*. 2020;5(6):66–76 (In Russ.). DOI: 10.29413/ABS.2020-5.6.8.
 13. *Dyment NA, Hagiwara Y, Matthews BG, Li Y, Kalajzic I, Rowe DW.* Lineage tracing of resident tendon progenitor cells during growth and natural healing. *PLoS One*. 2014;9(4):e96113. DOI: 10.1371/journal.pone.0096113.
 14. *Ni M, Rui YF, Tan Q, Liu Y, Xu LL, Chan KM et al.* Engineered scaffold-free tendon tissue produced by tendon-derived stem cells. *Biomaterials*. 2013;34(8): 2024–37. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.11.046.
 15. *Zhang C, Zhang E, Yang L, Tu W, Lin J, Yuan C et al.* Histone deacetylase inhibitor treated cell sheet from mouse tendon stem/progenitor cells promotes tendon repair. *Biomaterials*. 2018;172:66–82. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.03.043.
 16. *de Lima Santos A, Silva CGD, de Sá Barretto LS, Franciozi CEDS, Tamaoki MJS, de Almeida FG et al.* Biomechanical evaluation of tendon regeneration with adipose-derived stem cell. *J Orthop Res*. 2019;37(6):1281–6. DOI: 10.1002/jor.24182.
 17. *Augustyniak J, Bertero A, Coccini T, Baderna D, Buzanska L, Caloni F.* Organoids are promising tools for species-specific in vitro toxicological studies. *J Appl Toxicol*. 2019;39(12):1610–22. DOI: 10.1002/jat.3815.
 18. *Makarevich PI, Efimenko AYU, Tkachuk VA.* Biochemical regulation of regenerative processes by growth factors and cytokines: Basic mechanisms and relevance for regenerative medicine. *Biochemistry (Moscow)*. 2020;85(1):11–26. DOI: 10.1134/S0006297920010022.
 19. *Позябин С.В., Борхунова Е.Н., Сароян С.В., Комаров С.В., Довгий А.И.* Инновационные методы регенеративной медицины при лечении собак и кошек с язвенными кератитами: Учебное пособие. Москва: ЗооВетКнига, 2022. 138 с. DOI: 10.18720/SPBPU/2/z22-8.
Pozyabin SV, Borkhunova EN, Saroyan SV, Komarov SV, Dovgiy AI. Innovative methods of regenerative medicine in the treatment of dogs and cats with ulcerative keratitis: Textbook. Moscow: ZooVet-Kniga, 2022. 138 p. (In Russ.). DOI: 10.18720/SPBPU/2/z22-8.
 20. А.А. Соколов, А.И. Довгий, А.И. Колесникова. Материал стволовых клеток и способ его получения. Патент Российской Федерации 2644650. Заявитель и патентообладатель ООО «Т-Хелпер Клеточные Технологии» – № 2014148251. Заявлено 01.12.2014; опубликовано 27.06.2016. Бюллетень № 18. AA Sokolov, AI Dovgiy, AI Kolesnikova. Stem cell material and method for its production. Patent № 2644650 Russian Federation. Applicant and patent holder LLC “T-Helper Cellular Technologies” – No. 2014148251. Application 12.01.2014; published 06/27/2016. Bulletin No.18.

Информация об авторах

Михаил Дмитриевич Качалин – кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры ветеринарной хирургии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина.

Елена Николаевна Борхунова – доктор биологических наук, доцент, заведующая кафедрой анатомии и гистологии животных имени профессора А.Ф. Климova Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина.

Сергей Владимирович Позябин – доктор ветеринарных наук, профессор, ректор, заведующий кафедрой ветеринарной хирургии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина.

Людмила Михайловна Михалева – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Давид Александрович Арешидзе – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией патологии клетки НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Мария Александровна Козлова – научный сотрудник лаборатории патологии клетки НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Андрей Игоревич Довгий – кандидат биологических наук, генеральный директор ООО «Т-Хелпер Клеточные Технологии».

Author information

Mikhail D. Kachalin – Cand. Sci. (Vet.), Associate Professor, Department Veterinary Surgery, K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology.

<https://orcid.org/0000-0001-5942-8771>

Elena N. Borkhunova – Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Head of the Department of Animal Anatomy and Histology, K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology.

<https://orcid.org/0000-0003-2355-8616>

Sergey V. Pozyabin – Dr. Sci. (Vet.), Professor, Rector of the Academy, Head of the Department of Veterinary Surgery, K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology.

<https://orcid.org/0000-0002-3825-6082>

Liudmila M. Mikhaleva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, Head of the Laboratory of Clinical Morphology Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0003-2052-914X>

David A. Areshidze – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Cell Pathology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0003-3006-6281>

Maria A. Kozlova – Researcher, Laboratory of Cell Pathology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.

<https://orcid.org/0000-0001-6251-2560>

Andrew I. Dovgii – Cand. Sci. (Biol.), General Director, LLC “T-Helper Cell Technologies”.

<https://orcid.org/0000-0001-9510-7078>