

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 612.755+616-001.7:576.534

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-5-574-582>

Поступило в редакцию 04.05.2020

Received 04.05.2020

А.-М. В. Ерофеева¹, И. П. Жаворонок¹, О. А. Антипова¹, Е. Л. Рыжковская¹,
Т. Е. Кузнецова¹, И. Б. Василевич², С. В. Пинчук², академик И. Д. Волотовский²,
А. Ю. Молчанова¹

¹Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ НА НОЦИЦЕПТИВНУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И РЕПАРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТРАВМЕ АХИЛЛОВА СУХОЖИЛИЯ У КРЫС

Аннотация. На модели травмы ахиллова сухожилия у крыс изучен антиноцицептивный и регенеративный эффект аллогенной трансплантации различных доз мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) в область повреждения. Установлено, что аллогенная трансплантация МСК ЖТ ни в одном из тестируемых режимов не способствовала уменьшению величины отека травмированной конечности. Среди исследуемых режимов только двукратное введение $0,25 \cdot 10^6$ МСК ЖТ оказывало антиноцицептивное действие. Введение $0,50 \cdot 10^6$ МСК ЖТ способствовало ускоренному началу неоваскуляризации ткани сухожилия, одновременно усугубляя воспаление и образование грануляционной ткани. Двукратная трансплантация $0,25 \cdot 10^6$ МСК ЖТ приводила к ускорению реорганизации коллагеновых волокон, более поздней неоваскуляризации, однако наблюдалось отсутствие воспалительного инфильтрата, липоматоза и массивного образования грануляционной ткани в области травмы.

Ключевые слова: ахиллово сухожилие, мезенхимальные стволовые клетки, клеточная терапия, травма сухожилия, ноцицептивная чувствительность, тендинопатия

Для цитирования. Влияние аллогенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на ноцицептивную чувствительность и репаративные процессы при экспериментальной травме ахиллова сухожилия у крыс / А.-М. В. Ерофеева [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 5. – С. 574–582. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-5-574-582>

Anna-Maria V. Yerofeyeva¹, Irina P. Zhavoronok¹, Olga A. Antipova¹, Elena L. Ryzhkovskaya¹, Tatsiana E. Kuznetsova¹,
Irina B. Vasilevich², Sergey V. Pinchuk², Academician Igor D. Volotovskiy², Alla Yu. Molchanova¹

¹Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Biophysics and Cellular Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus

EFFECTS OF ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS ON NOCICEPTIVE SENSITIVITY AND REPAIR PROCESSES AT ACHILLES TENDON INJURY MODEL IN RATS

Abstract. On the model of Achilles tendon injury in rats, the antinociceptive and regenerative effect of allogeneic transplantation of various doses of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) into the lesion area was studied. It was found that neither of tested regimens of allogeneic transplantation of ADMSCs contributed to a decrease in the edema of the injured limb. Among the studied regimens, only a twofold administration of $0.25 \cdot 10^6$ ADMSCs exhibited an antinociceptive effect. Administration of $0.50 \cdot 10^6$ ADMSCs promoted the accelerated onset of neovascularization of tendon tissue, while enhancing inflammation and the formation of granulation tissue. Double transplantation of $0.25 \cdot 10^6$ ADMSCs led to accelerated reorganization of collagen fibers, later neovascularization, however, there was an absence of inflammatory infiltrate, lipomatosis, and massive formation of granulation tissue in the lesion area.

Keywords: Achilles tendon, mesenchymal stem cells, cell therapy, tendon injury, nociceptive sensitivity, tendinopathy

For citation: Yerofeyeva A.-M. V., Zhavoronok I. P., Antipova O. A., Ryzhkovskaya E. L., Kuznetsova T. E., Vasilevich I. B., Pinchuk S. V., Volotovskiy I. D., Molchanova A. Yu. Effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on nociceptive sensitivity and repair processes at achilles tendon injury model in rats. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 5, pp. 574–582 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-5-574-582>

Введение. Травмы сухожилий являются причиной около 30 % причин обращений пациентов по поводу повреждений костно-мышечной системы, на них приходится до 30–50 % случаев травм в спортивной практике [1; 2]. Высокая распространенность данной патологии связана в первую очередь с занятиями спортом, процессами старения, сахарным диабетом, гипотиреозом и длительным приемом кортикостероидов [3]. Естественный процесс заживления сухожилий является болезненным, длительным и низкоэффективным, поскольку ткань сухожилия обладает низким клеточным составом, слабой васкуляризацией, а также сложной многоуровневой организацией коллагеновых волокон [4]. При отсутствии должного лечения, данный процесс приводит к потере исходных биомеханических свойств, повторным микро- и макроразрывам сухожилия в 30 % случаев, хронической теналгии и, как следствие, завершению спортивной карьеры и инвалидности [4; 5]. Низкоинтенсивная лазерная терапия, протезирование, хирургическое и медикаментозное лечение травм сухожилий демонстрируют гетерогенные результаты [6], и в то же время длительны и связаны с большими финансовыми затратами. Ввиду вышесказанного, существует необходимость разработки эффективных методик терапии механических травм сухожилий, позволяющих достичь полной регенерации поврежденной ткани с сохранением ее функциональных и механических свойств.

В настоящее время растет интерес к исследованиям эффективности применения в регенеративной медицине мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ). Это связано главным образом со способностью МСК ЖТ секретировать широкий спектр биоактивных молекул, связанных с иммуномодуляцией и перестройкой микроокружения для подготовки к регенерации ткани или ее восстановления, а также отсутствием экспрессии маркеров иммуногенности [7]. В отличие от фибробластов, теноцитов и МСК из других источников, МСК ЖТ обладают более высокой пролиферативной активностью, и в то же время имеют подобные особенности роста и дифференцировки, а процесс их выделения наименее инвазивен и практически не имеет осложнений [8]. На данный момент эффективность терапевтического действия МСК ЖТ была показана на моделях тендинита у лошадей и кроликов *in vitro* и *in vivo* [7], а также успешно проведено первое клиническое испытание эффективности аллогенных МСК ЖТ при лечении эпикондилитов [9]. Несмотря на наличие результатов, демонстрирующих целесообразность применения данной популяции клеток в сфере лечения травм костно-мышечной системы, на сегодняшний день проведены лишь единичные доклинические исследования эффективности МСК ЖТ при острых механических травмах сухожилий, в частности, травме ахиллова сухожилия (АС), имеющих место не только в спорте, но и в повседневной жизни. Кроме того, отсутствуют данные об оптимальной дозе клеточного трансплантата, достаточной для желаемого терапевтического эффекта, что требует дальнейших исследований.

Цель работы – изучить влияние аллогенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в различных дозах на величину отека, ноцицептивную чувствительность поврежденной конечности, а также на регенеративные процессы в ткани ахиллова сухожилия при его экспериментальной травме у крыс.

Материалы и методы исследования. Исследование проводили на 126 половозрелых крысах-самцах стока Wistar с массой тела 230–250 г. Экспериментальных животных содержали в помещениях вивария ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» в стандартных условиях. Все манипуляции проведены в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в научных исследованиях. Протоколы экспериментов рассмотрены и одобрены комиссией по биоэтике при ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси». Животные были разделены на следующие группы: I – крысы с травмой АС без лечения, контрольная группа ($n = 24$); II – крысы с травмой АС, которым провели однократную трансплантацию МСК ЖТ в дозе $0,25 \cdot 10^6$ клеток/животное в область травмы ($n = 24$); III – крысы с травмой АС, которым в область травмы указанную дозу МСК ЖТ вводили двукратно ($n = 24$); IV – крысы с травмой АС, которым в область травмы однократно вводили МСК ЖТ в дозе $0,50 \cdot 10^6$ клеток/животное ($n = 24$); V – крысы с травмой АС и двукратной трансплантацией $0,50 \cdot 10^6$ МСК ЖТ в область травмы ($n = 24$); VI – интактные животные ($n = 6$).

Моделирование травмы АС осуществляли хирургическим путем в асептических условиях. После наркотизации тиопенталом натрия (30 мг/кг, внутривенно) и местной анестезии 1 %-ным раствором лидокаина (30–40 мкл), крыс фиксировали на термостабильном столике в положении лежа на животе. С дорсальной стороны левой голени в проекции прохождения АС выполняли линейный разрез кожи, затем предполагаемую область нанесения травмы мобилизовали. На область нижней трети АС накладывали прямой зубчатый зажим на 10 с, затем снимали зажим, но не перерезали сухожилие. Кожу ушивали простым узловым швом с помощью рассасывающегося шовного материала Сургикрол (Футберг, Беларусь).

Культирование МСК ЖТ, предварительно выделенных из жировой ткани интактных крыс согласно использованному ранее методу [10], проводилось на базе ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси». Введение МСК ЖТ объемом 250 мкл осуществляли в область травмы АС соответствующим группам животных согласно вышеописанным схемам: однократное введение МСК ЖТ проводили на 1-е сутки после моделирования травмы АС; двукратное введение – на 1-е и 3-и сутки соответственно. Терапевтический эффект различных схем введения МСК ЖТ оценивали в течение 28 суток на основании следующих показателей: общее состояние животных, величина отека травмированной конечности, ноцицептивные реакции на предъявление механического стимула, гистологический анализ тканей АС.

До моделирования травмы АС и ежедневно в течение 28 суток после нее визуально оценивали общее состояние животных по следующим показателям: прирост массы тела, внешний вид шерстяного покрова и слизистых оболочек, поведение, наличие патологических выделений, суточное потребление пищи и воды. Выраженность отека области травмы определяли по длине окружности, которую измеряли с помощью сантиметровой ленты 0,5 см проксимальнее бугра пяточной кости. Ноцицептивную чувствительность к механической стимуляции оценивали путем измерения порога ноцицептивной реакции (ПНР) на предъявление механического стимула в тесте «Рэндалла–Селитто» [11]. Тест проводили до операции и на 7, 14, 21 и 28-е сутки после нее с помощью алгезиметра «Давление на лапу» (PanLab, Испания). Измерения проводили для каждого животного трехкратно с интервалом 5–7 мин, полученные данные усредняли.

Параллельно измерениям ноцицептивной чувствительности, у части животных проводили эвтаназию с последующим вырезанием травмированного АС для гистологического исследования. Гистологические срезы толщиной 7 мкм изготавливали на микротоме-криостате HM-525 (Microm, Германия), затем окрашивали гематоксилин-эозином по стандартной методике. На приготовленных гистологических препаратах оценивали общий план строения АС, форму и расположение теноцитов среди коллагеновых волокон, а также форму их ядер, наличие воспалительного инфильтрата и степень васкуляризации ткани АС.

Статистическую и графическую обработку данных осуществляли с помощью пакетов программ OriginPro 9.1 (OriginLabCorp., США) и Statistica 10.0 (Statsoft, Россия). Полученные данные представлены в виде средних арифметических и стандартных ошибок ($M \pm m$). После проверки нормальности распределения значений с помощью критерия Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilk W -test), для оценки различий между контрольной и каждой экспериментальной группой проводились сравнения с помощью непарного двухвыборочного t -теста Стьюдента, для оценки различий между значением до моделирования травмы и значением через соответствующий период времени – парный двухвыборочный t -тест Стьюдента. Различия между группами принимались за статистически значимые при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. На протяжении эксперимента состояние животных было нормальным: отмечалось отсутствие патологических выделений и изменений шерстяного покрова и слизистых оболочек, положительная динамика роста массы тела. Во всех группах после моделирования травмы АС животные прихрамывали, подтягивая травмированную лапу, однако при этом их общее состояние не отличалось от интактной группы.

На 1-е сутки после моделирования травмы АС у контрольной и экспериментальных групп наблюдалось статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение окружности травмированной конечности, которое в среднем составило 29,4 %, с последующей тенденцией к снижению величины

отека (рис. 1). Восстановление исходной величины окружности травмированной конечности в контрольной группе наблюдалось к 28-м суткам после моделирования травмы. Однократная инъекция МСК ЖТ в дозе $0,25 \cdot 10^6$ клеток/животное в область травмы АС не оказывала существенного влияния ($p > 0,05$) на динамику изменения окружности травмированной конечности (рис. 1). Вместе с тем двукратное введение данной дозы способствовало увеличению окружности травмированной конечности относительно такого же параметра у животных с травмой АС без лечения ($p < 0,05$), начиная с 3-х суток наблюдения и далее. Аллогенная трансплантация $0,50 \cdot 10^6$ МСК ЖТ, независимо от кратности, не способствовала ускоренному восстановлению исходной окружности ипсилатеральной конечности ($p > 0,05$) (рис. 1).

При исследовании ноцицептивной чувствительности на предъявление механического стимула у животных с травмой АС без лечения наблюдалось развитие механической гипералгезии к 7-м суткам после операции, о чем свидетельствовало статистически значимое снижение ПНР на 14,8 % (с $134,8 \pm 2,4$ до $114,8 \pm 1,9$ г) ($p < 0,05$) (рис. 2). Изменения носили обратимый характер, и к 14-м суткам ПНР вернулся к исходному уровню ($p > 0,05$). Аллогенная трансплантация $0,25 \cdot 10^6$ МСК ЖТ в область травмы АС не оказывала антиноцицептивного действия: статистически значимое снижение ПНР отмечено на 7-е сутки на 14,4 % (с $133,5 \pm 1,9$ до $114,3 \pm 2,9$ г) ($p < 0,05$) и далее до 14-х суток включительно (снижение на 19,8 % (до $107,1 \pm 2,5$, $p < 0,05$) по сравнению со значением до травмы). В последующем наблюдалась тенденция к восстановлению исходного уровня ПНР к 28-м суткам наблюдения. В то же время двукратное введение МСК ЖТ в указанной дозе оказывало выраженное анальгетическое действие, что проявлялось в устранении механической гипералгезии на 7-е сутки после травмы АС, а также в повышении среднегрупповых значений ПНР на протяжении последующего периода исследования относительно как контрольной группы, так и значений до моделирования травмы ($p < 0,05$) (рис. 2).

Аллогенная трансплантация $0,50 \cdot 10^6$ МСК ЖТ не отменяла вызванного травмой снижения ПНР к 7-м суткам наблюдения (снижение на 12,3 %, с $123,6 \pm 1,7$ до $108,4 \pm 2,4$ г) ($p < 0,05$). С 14-х суток наблюдалась тенденция к восстановлению исходного уровня ПНР, а к 28-му дню после моделирования травмы отмечено возвращение ПНР к значению до травмы ($p > 0,05$). При двукратном введении указанной дозы МСК ЖТ наблюдалась картина, аналогичная таковой

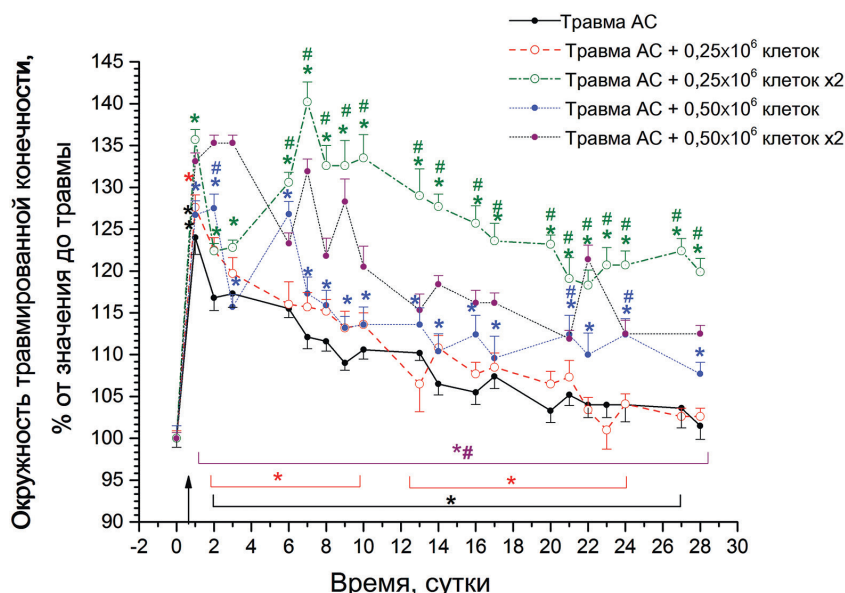


Рис. 1. Изменения окружности поврежденной конечности у крыс при травме ахиллова сухожилия (АС) и аллогенной трансплантации МСК ЖТ. Для каждой группы $n = 24$. Стрелкой отмечено время проведения операции по моделированию травмы АС. * – $p < 0,05$ по сравнению со значением до травмы; # – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Fig. 1. Changes in the circumference of the injured limb in rats with Achilles tendon (AT) injury and allogeneic transplantation of ADMSCs. For each group $n = 24$. The arrow indicates the timepoint of modeling of AT injury. * – $p < 0.05$ compared to the values before injury; # – $p < 0.05$ compared to the control

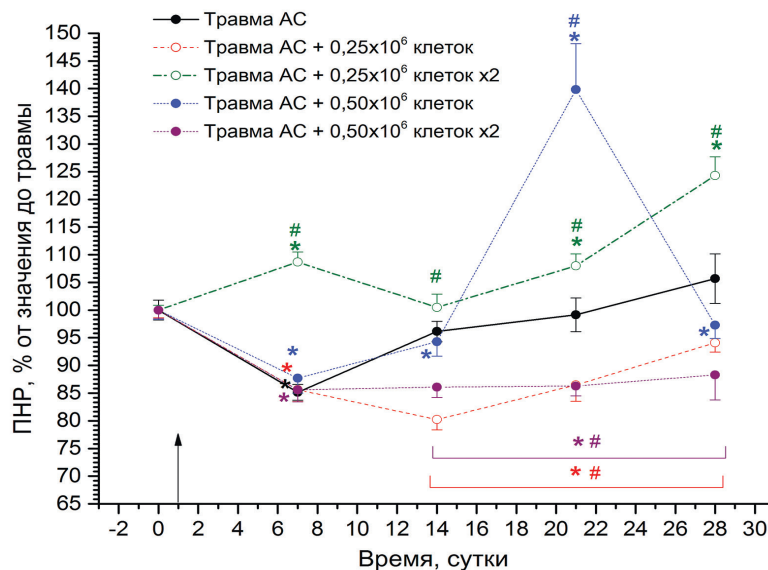


Рис. 2. Изменения порога ноцицептивной реакции (ПНР) травмированной конечности крыс на механический стимул в тесте Рэндалла–Селитто при травме ахиллова сухожилия (АС) и аллогенной трансплантации МСК ЖТ. Для каждой группы $n = 24$. Стрелкой отмечено время проведения операции по моделированию травмы АС. * – $p < 0,05$ по сравнению со значением до травмы; # – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Fig. 2. Changes in the mechanical withdrawal threshold (MWT) of the injured limb at Randall-Selitto test in rats with Achilles tendon (AT) injury and allogeneic transplantation of ADMSCs. For each group, $n = 24$. The arrow indicates the timepoint of modeling of AT injury. * – $p < 0.05$ compared to the value before injury; # – $p < 0.05$ compared to the control

после однократного введения $0,25 \cdot 10^6$ МСК ЖТ (рис. 2). Так, данный режим введения не устранял вызванную травмой механическую гипералгезию (снижение ПНР на 14,4 %, с $125,5 \pm 1,9$ до $107,4 \pm 2,7$ г, $p < 0,05$) по сравнению со значением до операции. В последующем наблюдалась тенденция к восстановлению базального уровня ПНР. Таким образом, как однократное, так и двукратное введение МСК ЖТ в дозе $0,50 \cdot 10^6$ клеток/крысу не способствует увеличению ПНР на предъявление механического стимула.

В результате сравнительного гистологического анализа препаратов АС крыс контрольной группы с препаратами АС животных после травматического повреждения и введения МСК ЖТ во всех группах животных была выявлена однотипная направленность течения репаративного процесса. Степень выраженности дегенеративных и дистрофических изменений уменьшалась по мере увеличения продолжительности эксперимента: 7, 14, 21 и 28-е сутки от нанесения травмы и соответственно от введения МСК ЖТ.

Так, у животных с травмой АС без лечения начало процессов ревазуляризации и фибриллогенеза в зоне дегенеративно-дистрофического повреждения выявлялось на 28-е сутки после операции. Наряду с появлением большого количества незрелых фибробластов наблюдался незначительный рост сосудов микроциркуляторного русла. Характерные для нормального сухожилия теноциты, с узкими и длинными ядрами, были немногочисленны. Наблюдаемое на всех сроках эксперимента изменение архитектоники коллагеновых волокон (разволокнение, неравномерность их толщины, нарушение продольной ориентации) является свидетельством нарушения прочностных качеств сухожилия (рис. 3).

После однократной трансплантации $0,25 \cdot 10^6$ МСК ЖТ в области травматического повреждения АС на 21-е сутки эксперимента в травмированном сухожилии определялись новообразованные пучки коллагеновых волокон, в расширенных просветах эндотендиния выявлялись многочисленные сосуды микроциркуляторного русла, теноциты характеризовались различной степенью дифференцировки – молодые теноциты с округлым или овальным ядром, зрелые клетки с длинными узкими ядрами. Фибробласты различались формой и размерами ядер, располагались вдоль коллагеновых волокон. В эндотендинии определялись клетки фибробластического дифферона и клетки лейкоцитарного ряда (рис. 4, а). На 28-е сутки при исследовании участков

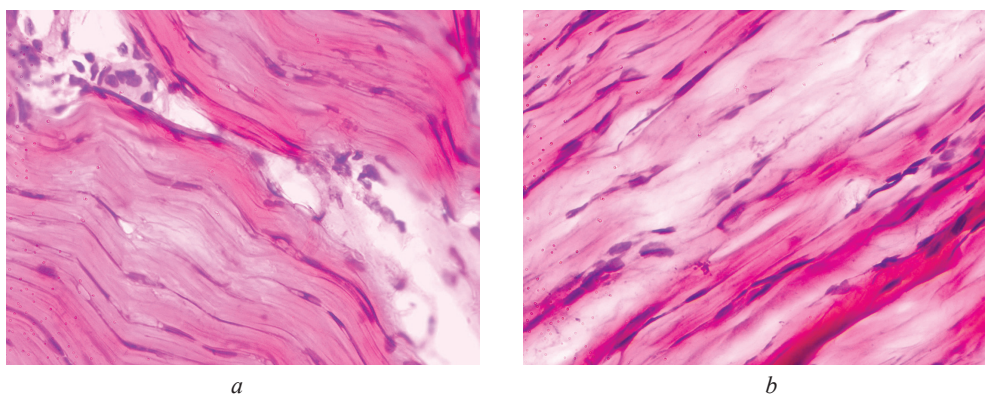


Рис. 3. Ахиллово сухожилие контрольных крыс на 21-е (*a*) и 28-е (*b*) сутки после моделирования травмы. Микрофото. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: $\times 400$

Fig. 3. Achilles tendon of control rats on the 21st (*a*) and 28th (*b*) days after injury. Microphoto. Hematoxylin and eosin stain. Magnification: $\times 400$

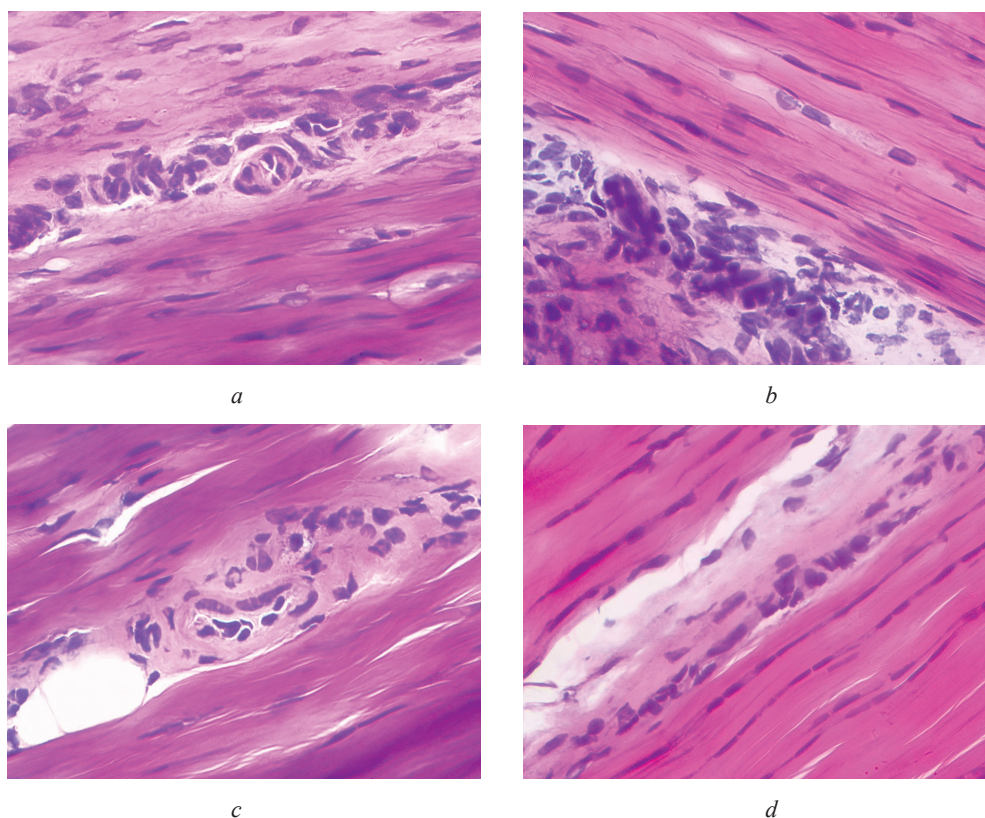


Рис. 4. Ахиллово сухожилие опытных крыс на 21-е сутки после моделирования травмы и аллогенной трансплантации МСК ЖТ в дозе $0,25 \cdot 10^6$ клеток (*a* – однократное введение, *b* – двукратное), $0,50 \cdot 10^6$ клеток (*c* – однократное введение, *d* – двукратное). Микрофото. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: $\times 400$

Fig. 4. Achilles tendon of experimental rats on the 21st day after injury and allogeneic transplantation of ADMSCs at a dose of $0,25 \cdot 10^6$ cells (*a* – single administration, *b* – double), $0,50 \cdot 10^6$ cells (*c* – single administration, *d* – double). Microphoto. Hematoxylin and eosin stain. Magnification: $\times 400$

АС в области травматического повреждения отличительных особенностей от предыдущей серии эксперимента не выявлено.

В результате двукратного введения $0,25 \cdot 10^6$ МСК ЖТ на 21-е сутки наблюдалось частичное восстановление продольной ориентации и четкости контуров пучков коллагеновых волокон, выраженная неоваскуляризация, уменьшение количества поврежденных и дезорганизованных структур, увеличение количества клеточных элементов (рис. 4, *b*), что является свидетельством

активизации восстановительных процессов в поврежденном сухожилии. Эндотендин и перитендин содержали большое количество сосудов. Между перитендием и окружающей сухожилие тканью четкой границы не просматривалось, определялось разрастание грануляционной ткани разной степени зрелости, выявлялись адипоциты, макрофаги, гистиоциты, плазматические и тучные клетки. На отдельных участках между пучками продольно ориентированных коллагеновых волокон располагались теноциты с узкими вытянутыми ядрами и удлинённой цитоплазмой, что характерно для физиологической нормы. На 28-е сутки по-прежнему наблюдалась гиперклеточность сухожилия за счет скопления клеток фибробластического ряда.

При однократном введении МСК ЖТ в дозе $0,50 \cdot 10^6$ клеток на всех сроках наблюдения отмечались выраженные клеточные реакции воспалительно-репаративного процесса. По сравнению с контролем определялось увеличение площади перитендиния, в котором выявлялся полиморфно-клеточный инфильтрат со значительным количеством сегментоядерных лимфоцитов, отмечалось образование грануляционной ткани и скопления жировых клеток. Между пучками коллагеновых волокон, с преимущественно упорядоченным строением, располагались теноциты с овальными ядрами и слегка удлинённой цитоплазмой. На отдельных участках между неравномерно расположенными пучками коллагеновых волокон отмечалась гиперклеточность сухожилия за счет скопления фиброцитов и фибробластов с различной организацией ядер и цитоплазмы (рис. 4, с).

Выраженная неоваскуляризация зоны повреждения АС, наблюдаемая на 7-е сутки эксперимента при двукратном введении МСК ЖТ в дозе $0,50 \cdot 10^6$ клеток, является благоприятным фактором, влияющим на регенерацию сухожилия: увеличивается скорость восстановительных процессов, что подтверждается гистохимическими исследованиями активности окислительно-восстановительных ферментов. Энергообразование в теноцитах происходило преимущественно за счет более энергетически выгодного цикла Кребса, гликолитические процессы были снижены. Однако наряду с образованием сосудов, на этом этапе, как и в предыдущей серии, отмечалось наличие воспалительного инфильтрата и диффузно-очагового липоматоза наряду с образованием грануляционной ткани. На 21-е сутки эксперимента, по сравнению с предыдущими сериями, коллагеновые пучки первого порядка отличались незначительной извилистостью, располагались параллельно друг другу, приобретали продольную ориентацию. Между пучками второго порядка выявлялся расширенный эндотендин, в котором наблюдалось большое количество клеточных элементов, единичные адипоциты. Клетки сухожилия различались формой и размерами ядер, располагались вдоль коллагеновых волокон. Немногочисленные адипоциты, гистиоциты, макрофаги, плазматические и тучные клетки в основном определялись в перитендинии сухожилия. Кровеносные сосуды (капилляры и артериолы) выявлялись как в эндотендинии, так и в перитендинии, но в эндотендинии они были единичны (рис. 4, d).

Способность МСК ЖТ оказывать анальгетическое и противовоспалительное действие в месте повреждения предположительно связывают со свойством данной популяции клеток секретировать в ответ на провоспалительное микроокружение такие иммуномодулирующие субстанции, как трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), интерлейкин-10 (IL-10) и антагонист рецептора к интерлейкину-1 (IL-1Ra). Согласно Harrel и соавт. [8], такая паракринная активность МСК ЖТ в месте травмы способна сохраняться длительное время после введения. В данном исследовании однократное введение МСК ЖТ в дозе $0,25 \cdot 10^6$ клеток на крысу на фоне травмы АС усугубляет механическую гипералгезию по сравнению с животными без лечения и способствует разрастанию грануляционной ткани. Последнее, в комплексе с вводимым объемом клеточного трансплантата, оказывает дополнительное воздействие на механорецепторы, приводя к снижению ПНР на механический стимул. Несмотря на индукцию разрастания грануляционной ткани, двукратное введение $0,25 \cdot 10^6$ МСК ЖТ оказывало выраженный антиноцицептивный эффект на протяжении всего периода наблюдения. По-видимому, в данном случае пул секреторируемых МСК ЖТ факторов в области травмы АС снижает ноцицептивную чувствительность конечности, перекрывая влияние воздействия грануляционной ткани на механорецепторы.

В то же время однократная трансплантация $0,50 \cdot 10^6$ МСК ЖТ не оказывала антиноцицептивного эффекта, а двукратное введение данной дозы МСК ЖТ, наоборот, негативно сказа-

лось на ноцицептивной чувствительности, несмотря на раннюю неоваскуляризацию и позитивные изменения в расположении и форме коллагеновых волокон, наблюдаемые при данном режиме введения на более поздних сроках эксперимента. Предположительно, данные режимы введения в область травмы АС оказались чрезмерно обильными относительно размеров АС, что усилило воспалительную реакцию в сухожилии в ответ на травму и элиминировало антиноцицептивное действие клеточного трансплантата.

Заключение. На основании полученных нами данных можно заключить, что двукратная трансплантация $0,25 \cdot 10^6$ МСК ЖТ в область травмы АС является наиболее оптимальной схемой введения в плане анальгетического и регенераторного действия в тканях травмированного сухожилия у крыс. Введение более высоких доз МСК ЖТ способствовало появлению воспалительного инфильтрата, очагового липоматоза и выраженным разрастанием грануляционной ткани, что, вероятно, нивелировало эффект клеточного трансплантата на ноцицептивную чувствительность. Полученные результаты указывают на необходимость соблюдения оптимального баланса между эффективностью и безопасностью. Поскольку противовоспалительные свойства МСК ЖТ активируются в основном под действием провоспалительного микроокружения ткани-мишени [7], следует также помнить о соотношении объема вводимого клеточного продукта и площади повреждения тканей. Для оценки изменений в области травмы, вызванных трансплантацией МСК ЖТ, их влияние на ноцицептивную чувствительность и функциональное состояние ткани сухожилия в более позднем периоде, необходимы дальнейшие исследования.

Список использованных источников

1. Progress in cell-based therapies for tendon repair / D. Gaspar [et al.] // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2015. – Vol. 84. – P. 240–256. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.023>
2. Recurrence of Achilles tendon injuries in elite male football players is more common after early return to play: an 11-year follow-up of the UEFA Champions League injury study / M. Gajhede-Knudsen [et al.] // *Br. J. Sports Med.* – 2013. – Vol. 47, N 12. – P. 763–768. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2013-092271>
3. Tendon – function-related structure, simple healing process and mysterious ageing / J. Zabrzynski [et al.] // *Folia Morphol.* – 2018. – Vol. 77, N 3. – P. 416–427. <https://doi.org/10.5603/fm.a2018.0006>
4. Stem cell therapy for tendon regeneration: current status and future directions / S. Conrad [et al.] // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2018. – P. 61–93. https://doi.org/10.1007/5584_2018_194
5. The pain of tendinopathy: physiological or pathophysiological? / E. Rio [et al.] // *Sports Med.* – 2014. – Vol. 44, N 1. – P. 9–23. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0096-z>
6. Tendinopathy: injury, repair, and current exploration / K. Lipman [et al.] // *Drug Design, Development and Therapy.* – 2018. – Vol. 12. – P. 591–603. <https://doi.org/10.2147/dddt.s154660>
7. Spees, J. L. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function / J. L. Spees, R. H. Lee, C. A. Gregory // *Stem Cell Res. Ther.* – 2016. – Vol. 7, N 1. – P. 125–138. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0363-7>
8. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts / S. M. Melief [et al.] // *Stem Cells Transl. Med.* – 2013. – Vol. 2, N 6. – P. 455–463. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0184>
9. Injured Achilles tendons treated with adipose-derived stem cells transplantation and GDF-5 / A. de Aro [et al.] // *Cells.* – 2018. – Vol. 7, N 9. – 22 p. <https://doi.org/10.3390/cells7090127>
10. Морфофункциональное состояние мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крыс в условиях подавления окислительного стресса / И. Б. Василевич [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук.* – 2014. – № 2. – С. 82–88.
11. Randall Selitto pressure algometry for assessment of bone-related pain in rats / S. Falk [et al.] // *Eur. J. Pain.* – 2015. – Vol. 19, N 3. – P. 305–312. <https://doi.org/10.1002/ejp.547>

References

1. Gaspar D., Spanoudes K., Holladay C., Pandit A., Zeugolis D. Progress in cell-based therapies for tendon repair. *Advance Drug Delivery Reviews*, 2015, vol. 84, pp. 240–256. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.023>
2. Gajhede-Knudsen M., Ekstrand J., Magnusson H., Maffulli N. Recurrence of Achilles tendon injuries in elite male football players is more common after early return to play: an 11-year follow-up of the UEFA Champions League injury study. *British Journal of Sports Medicine*, 2013, vol. 47, no. 12, pp. 763–768. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2013-092271>
3. Zabrzynski J., Łapaj Ł., Paczesny Ł., Zabrzynska A., Grzanka D. Tendon – function-related structure, simple healing process and mysterious ageing. *Folia Morphologica*, 2018, vol. 77, no. 3, pp. 416–427. <https://doi.org/10.5603/fm.a2018.0006>
4. Conrad S., Weber K., Walliser U., Geburek F., Skutella T. Stem cell therapy for tendon regeneration: current status and future directions. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 2018, pp. 61–93. https://doi.org/10.1007/5584_2018_194

5. Rio E., Moseley L., Purdam C., Samiric T., Kidgell D., Pearce A. J., Jaberzadeh S., Cook J. The pain of tendinopathy: physiological or pathophysiological? *Sports Medicine*, 2014, vol. 44, no. 1, pp. 9–23. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0096-z>
6. Lipman K., Wang C., Ting K., Soo C., Zheng Z. Tendinopathy: injury, repair, and current exploration. *Drug Design, Development & Therapy*, 2018, vol. 12, pp. 591–603. <https://doi.org/10.2147/dddt.s154660>
7. Spees J. L., Lee R. H., Gregory C. A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Research & Therapy*, 2016, vol. 7, no. 1, pp. 125–138. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0363-7>
8. Melief S. M., Zwavinga J. J., Fibbe W. E., Roelofs H. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Translational Medicine*, 2013, vol. 2, no. 6, pp. 455–463. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0184>
9. de Aro A. A., Carneiro G., Teodoro L., da Veiga F., Ferrucci D., Simões G., Simões P., Álvares L., de Oliveira A., Vicente C., Gomes C., Pesquero J., Esquisatto M., de Campos Vidal B., Pimentel E. Injured Achilles tendons treated with adipose-derived stem cells transplantation and GDF-5. *Cells*, 2018, vol. 7, no. 9, 22 p. <https://doi.org/10.3390/cells7090127>
10. Vasilevich I. B., Pinchuk S. V., Lobanok E. S., Volotovskii I. D. Morphology-function state of rat adipose-derived mesenchymal stem cells under the suppression of oxidative stress. *Vestsi Natsyyanal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2014, no. 2, pp. 82–88 (in Russian).
11. Falk S., Ipsen D. H., Appel C. K., Ugarak A., Durup D., Dickenson A. H., Heegaard A. M. Randall Selitto pressure algometry for assessment of bone-related pain in rats. *European Journal of Pain*, 2015, vol. 19, no. 3, pp. 305–312. <https://doi.org/10.1002/ejp.547>

Информация об авторах

Ерофеева Анна-Мария Вадимовна – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: amyerofofeeva@zoho.eu.

Жаворонок Ирина Петровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: iri8308@yandex.ru.

Антипова Ольга Александровна – науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: mayuha@yandex.ru.

Рыжковская Елена Леонидовна – ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ryzhkovskaya@mail.ru.

Кузнецова Татьяна Евгеньевна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tania_k@mail.ru.

Василевич Ирина Борисовна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: irina-vasilevich@yandex.by.

Пинчук Сергей Владимирович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: pinchuksv@mail.ru.

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovskii@yahoo.com.

Молчанова Алла Юрьевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: alla@fizio.bas-net.by.

Information about the authors

Yerofeyeva Anna-Maria V. – Junior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: amyerofofeeva@zoho.eu.

Zhavoronok Irina P. – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: iri8308@yandex.ru.

Antipova Olga A. – Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mayuha@yandex.ru.

Ryzhkovskaya Elena L. – Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ryzhkovskaya@mail.ru.

Kuznetsova Tatiana E. – Ph. D. (Biology), Associate professor, Leading researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tania_k@mail.ru.

Vasilevich Irina B. – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irina-vasilevich@yandex.by.

Pinchuk Sergei V. – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pinchuksv@mail.ru.

Volotovskii Igor D. – Academician, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovskii@yahoo.com.

Molchanova Alla J. – Ph. D. (Biology), Head of the Laboratory. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alla@fizio.bas-net.by.