

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

САВЧУК ТАРАС ЛЮБОМИРОВИЧ

УДК 602.9:636.09:611.71-044.342

**РЕГЕНЕРАТИВНІ ПРОЦЕСИ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО
УШКОДЖЕНІЙ КІСТКОВІЙ ТКАНИНІ КРОЛІВ ТА ВПЛИВ
СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ЇХ СТИМУЛЯЦІЮ**

16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник доктор ветеринарних наук, професор,
член-кореспондент НААН
Мазуркевич Анатолій Йосипович,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
професор кафедри хірургії і патофізіології
імені академіка І. О. Поваженка

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, професор
Коцюмбас Галина Іванівна,
Львівський національний університет
ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С. З. Гжицького,
завідувач кафедри нормальної
та патологічної морфології і судової ветеринарії

доктор ветеринарних наук, професор
Скрипка Марина Вікторівна,
Одеський державний аграрний університет,
професор кафедри нормальної
і патологічної анатомії та патофізіології

Захист відбудеться «19» квітня 2019 року о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «18» березня 2019 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Н. Г. Грушанська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Розроблення нових методів прискорення процесів регенерації ушкодженої кісткової тканини нині набуває особливого значення, оскільки кількість ускладнень, пов'язаних із порушенням або сповільненням процесів регенерації кісткової тканини, залишається досить високою. Повне відновлення кісткової тканини часто відбувається із порушенням консолідації кісткових відламків. Результатом цього є уповільнення зрощення або незрощення кісткових відламків та утворення хибних суглобів, а великі дефекти не можуть спонтанно відновлюватися (Петренко О. Ф., 2006; Корж Н. А., 2006; Дедух Н. В., 2008; Lang I., 2008).

Методи клітинно-регенеративної терапії з використанням стовбурових клітин все більше використовуються з надією на успіх у лікуванні різних ран і травм, на які неможливо ефективно впливати сучасними методами лікування (Грищенко В. І., 2000; Ліщук В. А., 2003; Linda L., 2007; Zhang Z. Y., 2010; Dimarino A. M., 2010; Grassi L., 2015).

Мезенхімальні стовбурові клітини ссавців вважаються найбільш перспективним видом аутогенного й аlogenного матеріалу у клітинній регенеративній терапії (Alison M. R., 2004; Hao W., 2007; Салютін Р. В., 2011). Зокрема, велика кількість публікацій, присвячених результатам клінічного використання мезенхімальних стовбурових клітин у лікуванні тварин за патології апарату руху, свідчить про обґрунтованість цього методу та наукове його значення (Kevin B., 2007; Шимон В. М., 2011; Kittaka M., 2015).

Дослідження з вивчення біологічних властивостей мезенхімальних стовбурових клітин тваринного походження у ветеринарній медицині України вперше було розпочато на кафедрі фізіології, патофізіології та імунології тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України (Мазуркевич А. Й., 2006) та набуло свого розвитку в подальші роки (Ковпак В. В., 2008; Харкевич Ю. О., 2010; Малюк М. О., 2016).

Водночас, залишаються мало дослідженими питання вибору найбільш ефективних методичних підходів щодо застосування стовбурових клітин за ушкодження кісткової тканини. Остаточо не визначено дози та шляхи їх введення в кожному конкретному випадку, протипоказання до їх застосування.

Отже, дослідження властивостей стовбурових клітин тварин та їх використання за експериментального ушкодження кісткової тканини є досить актуальним і своєчасним завданням, яке сприятиме розробленню науково обґрунтованих і ефективних методів клітинної терапії у ветеринарній медицині.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано як складову частину науково-дослідної роботи кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України за темами «Дослідити особливості коригуючої дії введених стовбурових клітин на патологічно змінені структури і функції тканин в організмі тварин-реципієнтів» (номер державної реєстрації 0115U003476, 2015–2017 рр.); «Розробити нові способи стимуляції процесів відновлення ушкоджених тканин опорно-рухового апарату домашніх

тварин методами клітинної терапії» (номер державної реєстрації 0118U000307, 2018–2020 рр.).

Мета та завдання дослідження. Мета дисертації – дослідити перебіг репаративного процесу в кістковій тканині за експериментального ушкодження та вивчити стимулюючий вплив на нього аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку за різних шляхів введення.

Для досягнення мети поставлено такі завдання:

– відтворити модель патологічного процесу в кістковій тканині шляхом її механічного ушкодження;

– дослідити перебіг репаративного остеогенезу за рентгенологічними, макроскопічними, мікроскопічними змінами в зоні ушкодження і біохімічними показниками сироватки крові до та після застосування аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин;

– порівняти ефективність двох методів застосування аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин у кровоносне русло і безпосередньо в місце ушкодження кісткової тканини;

– вдосконалити спосіб прижиттєвого отримання кісткового мозку у дрібних тварин.

Об'єкт дослідження – репаративні процеси в експериментально ушкодженій кістковій тканині за впливу аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин.

Предмет дослідження – структурні зміни у кістковій тканині та біохімічні показники крові за експериментального ушкодження великогомілкової кістки, перебіг і стимуляція репаративного остеогенезу аlogenними мезенхімальними стовбуровими клітинами кісткового мозку.

Методи дослідження: хірургічні (отримання кісткового мозку, моделювання експериментального дефекту кісткової тканини); гістологічні (виготовлення і фарбування зрізів та виявлення мікроскопічних змін); біотехнологічні (культивування стовбурових клітин *in vitro*); рентгенологічні (проведення рентгенодіагностики ушкодженої кістки); біохімічні (визначення вмісту Кальцію, Фосфору та активності лужної фосфатази у сироватці крові); статистичні (обробка цифрових показників і результатів лабораторних аналізів).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше досліджено вплив аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин на перебіг репаративного остеогенезу в експериментально змодельованому дефекті великогомілкової кістки кроля. Встановлено, що за впливу трансплантованих аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин спостерігається активізація і прискорення всіх фаз репаративного остеогенезу та одночасно відбувається нормалізація біохімічних показників крові.

Використання комплексного підходу до оцінки змін у зоні ушкодження кісткової тканини за показниками рентгенологічних, макроскопічних, гістологічних та біохімічних досліджень сироватки крові дозволило отримати об'єктивні результати оцінки особливостей змін на всіх фазах репаративної регенерації. Встановлено, що механічне ушкодження кісткової тканини спричинює виражену реакцію з боку кісткової тканини, прилеглих м'яких

тканин і загальної реакції організму. За введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин спостерігається прискорення реакції прилеглих м'яких тканин, утворення волокнистої сполучної тканини, кісткового мозоля, стимуляція остеогенезу, і консолідація кісткової тканини проходить швидше. За цих умов відновлення дефекту завершується практично вже на 28 добу дослідження, тоді як у тварин контрольної групи на 42 добу.

Вперше проведено випробовування ефективності двох методів застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на репаративний остеогенез. За введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин безпосередньо в місце експериментального ушкодження кісткової тканини процеси відновлення на всіх фазах репаративної регенерації більш інтенсивно виражені, ніж після введення їх у яремну вену. Водночас, починаючи вже з 3 доби експерименту, дефект заповнений переважно новоутвореною волокнистою сполучною тканиною, місце ушкодження кістки прикривається досить товстим шаром щільної волокнистої сполучної тканини і відбувається більш інтенсивна стимуляція остеогенезу, що має велике значення для консолідації тканини кісткового дефекту саме в цей період.

Вдосконалено спосіб прижиттєвого отримання кісткового мозку у дрібних тварин, який рекомендовано для використання у клінічній практиці ветеринарної медицини як низькотравматичний та безпечний у виконанні. Наукову новизну методу захищено патентом України на корисну модель «Спосіб прижиттєвого отримання кісткового мозку у дрібних тварин».

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати досліджень можуть бути використані в науковій сфері та навчальній роботі для вивчення і поглиблення знань щодо впливу стовбурових клітин на регенеративні процеси в тканинах, а також в клінічній практиці як один із альтернативних методів лікування тварин за ушкодження кісткової тканини.

Основні результати досліджень увійшли до науково-методичних рекомендацій «Методи видоспецифічної оцінки стовбурових клітин та їх застосування у ветеринарній клітинній регенеративній терапії» (*затверджено Вченою радою Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 5 від 27.12.2017 р.*) та використовуються у навчальному процесі під час викладання дисциплін кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка і кафедри анатомії, гістології і патоморфології тварин імені академіка В. Г. Касьяненка Національного університету біоресурсів і природокористування України; кафедри нормальної та патологічної фізіології тварин Білоцерківського національного аграрного університету; кафедри нормальної та патологічної фізіології імені С. В. Стояновського Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького; кафедри нормальної і патологічної анатомії та фізіології тварин Полтавської державної аграрної академії; кафедри нормальної і патологічної фізіології тварин Харківської державної зооветеринарної академії; кафедри фізіології та біохімії сільсько-господарських тварин Дніпровського державного аграрно-економічного

університету; кафедри анатомії, нормальної та патологічної фізіології тварин Сумського національного аграрного університету.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем вперше встановлено вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на відновлювальні процеси у кістковій тканині кролів та здійснено порівняння двох методів введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин – у яремну вену і безпосередньо в місце ушкодження. Особисто проведено пошук і аналіз літературних джерел за темою дисертації, виконано увесь обсяг експериментальних досліджень, проведено статистичну обробку цифрових показників, підготовлено ілюстративні матеріали.

Спільно з науковим керівником визначено мету, завдання роботи та способи їх вирішення, аналіз одержаних результатів і формулювання висновків. Із результатів досліджень і публікацій із співавторами, за їх згодою, використано лише ті результати, які одержано особисто здобувачем. Внесок автора зазначено у наведеному списку публікацій.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації доповідались, обговорювались та отримали позитивну оцінку на: XV Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (м. Львів, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Ветеринарне забезпечення інтенсивних технологій у тваринництві, безпека та якість харчових продуктів» (м. Біла Церква, 2017 р.); XVI Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених, присвяченій пам'яті першого заступника директора з наукової роботи професора В. М. Головача «Молоді учені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (м. Львів, 2017 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 95-річчю Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету та 110-річчю від дня народження професора Л. А. Христової «Досягнення та перспективи застосування гумінових речовин у сільському господарстві» (м. Дніпро, 2017 р.); IV Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми наук про життя та природокористування» (м. Київ, 2018 р.).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 10 наукових праць, з яких 3 статті у наукових фахових виданнях України, 3 статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, патент України на корисну модель, науково-методичні рекомендації та 2 тези наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено на 178 сторінках комп'ютерного тексту, вона складається з анотацій, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, обговорення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел і додатків. Список використаних джерел налічує 228 найменувань, у тому числі 116 латиницею. Дисертацію ілюстровано 8 таблицями та 98 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Вибір напрямів досліджень, матеріали та методи досліджень. Дисертацію виконано впродовж 2015–2018 років у навчально-науковій лабораторії «Центр клітинних технологій у ветеринарній медицині» кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Окремі фрагменти досліджень виконано на базі патоморфологічного відділу Державної установи «Інститут травматології та ортопедії Академії медичних наук України» (м. Київ), ветеринарної лабораторії «Бальд» (м. Київ), кафедри анатомії, гістології і патоморфології тварин імені академіка В. Г. Касьяненка, лабораторії ветеринарної рентгенології та рентгенодіагностики кафедри терапії і клінічної діагностики, лабораторії остеосинтезу тварин кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України (м. Київ).

Утримання тварин та їх використання в експериментах здійснювали з дотриманням вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (15.12.2009 р. Відомості ВР, 2010, № 9), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених I Національним конгресом з біоетики (20.09.2004 р., м. Київ), положень «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (м. Страсбург, 1986) та директиви Європейського Парламенту та Ради Європи (№ 2010/63/EU від 22.09.2010 р.).

У дослідженнях було використано кролів (78 голів) та алогенні мезенхімальні стовбурові клітини кролів, отримані від здорових тварин-донорів. Дослідження проведено в чотири етапи.

На *першому етапі* здійснювали:

– отримання аспірату червоного кісткового мозку від кролів із епіфізу стегнової кістки за методикою прижиттєвого отримання кісткового мозку у дрібних тварин у розробленій модифікації;

– виділення з отриманого аспірату фракції моноклеарних клітин із високою проліферативною активністю за методикою, розробленою співробітниками кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка;

– напрацювання необхідної кількості алогенних мезенхімальних стовбурових клітин, шляхом культивування з періодичним їх пасажуванням за методикою, розробленою співробітниками кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка.

На *другому етапі* моделювали патологічний процес у кістковій тканині нанесенням округлого дефекту (діаметром 2,5 мм і глибиною 0,5 мм) із медіальної поверхні, в середній третині діафізу великогомілкової кістки за допомогою хірургічного свердла.

На *третьому етапі* формували три групи тварин з експериментально ушкодженою кістковою тканиною (контрольна і дві дослідні). Тваринам одноразово вводили за допомогою шприца:

– кролям контрольної групи – 0,5 мл фосфатно-буферного розчину у місце експериментального ушкодження кістки;

– кролям I дослідної групи – 3,5 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у 0,5 мл фосфатно-буферного розчину в кровоносне русло (яремна вена);

– кролям II дослідної групи – 3,5 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин безпосередньо в місце експериментального ушкодження кістки.

На *четвертому етапі* вели спостереження за дослідними тваринами впродовж 42 діб. На 3 добу, 7, 14, 21, 28, 42 добу після введення відбирали проби для дослідження експериментально ушкодженої кісткової тканини.

У п'яти тварин з кожної групи відбирали кров з яремної вени для біохімічного аналізу сироватки крові (досліджували вміст Кальцію, Фосфору та активність лужної фосфатази). Біохімічні дослідження проводили за допомогою біохімічного аналізатора RT-9600 згідно з інструкцією.

У трьох тварин з кожної групи проводили рентгенологічні дослідження в зоні ушкодження великогомілкової кістки, в двох проєкціях апаратом «Вател-1» відповідно до інструкції. Крім того, з кожної групи виводили з досліду по три тварини методом евтаназії (шляхом внутрішньовенного введення 90 мг/кг натрію тіопенталу) та відбирали великогомілкову кістку для макроскопічного дослідження.

Гістологічні дослідження проводили згідно з інструкцією. Для цього відібрану великогомілкову кістку етикетували і фіксували у 10 % водному розчині нейтрального формаліну протягом 7 діб. Після фіксації проводили декальцинацію кісткової тканини в 5 % розчині азотної кислоти протягом 72 год. Потім із декальцинованої кістки в місці експериментального ушкодження вирізали шматочки завтовшки 2–3 мм. Відібрані шматочки промивали водопровідною водою, зневоднювали у водних розчинах етилового спирту зростаючої концентрації та ущільнювали целоїдином. Гістологічні зрізи товщиною 7–9 мкм виготовляли за допомогою санного мікротому, забарвлювали їх гематоксиліном Караці та еозином і Ван Гізоном. Зафарбовані гістологічні препарати досліджували під мікроскопом «Micros MSI 100 LED», оцінювали, враховуючи поверхневу структуру кістки, будову новоутвореної тканини, а також наявність і характер розташування клітинних елементів у ділянці ушкодження.

Проводили статистичну обробку цифрового матеріалу, використовуючи пакет статистичних програм Microsoft Excel, та аналіз отриманих результатів досліджень. Матеріал для ілюстрацій фотографували фотоапаратом «Canon EOS 550D» і «SONY DSC-W120».

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Рентгенологічні дослідження великогомілкової кістки. На 3 добу експерименту у кролів контрольної групи дефект був округлої форми, інших змін не спостерігалось. У кролів I дослідної групи, яким вводили алогенні мезенхімальні стовбурові клітини в яремну вену, спостерігали незначну реакцію з боку прилеглих м'яких тканин у місці ушкодження та початок формування кісткового мозоля. У кролів II дослідної групи, яким вводили алогенні мезенхімальні стовбурові клітини у місце дефекту, спостерігали незначну реакцію з боку прилеглих м'яких тканин, ознаки утворення кісткового мозоля, зменшення діаметра і глибини округлого дефекту кістки.

На 7 добу експерименту у кролів контрольної групи спостерігали незначну реакцію з боку прилеглих м'яких тканин і початок формування кісткового мозоля, а діаметр дефекту та його глибина не змінилися (рис. 1 А). Помічали початок консолідації кісткового дефекту. У кролів I дослідної групи спостерігали виражену реакцію з боку прилеглих м'яких тканин, ознаки утворення кісткового мозоля, зменшення діаметра і глибини дефекту кістки (рис. 1 Б). Спостерігалася консолідація кісткового дефекту. У кролів II дослідної групи спостерігали добре виражену реакцію з боку прилеглих м'яких тканин, а також виражені ознаки розвитку кісткового мозоля у вигляді осередків окостеніння. Діаметр та глибина округлого дефекту зменшилися (рис. 1 В). Спостерігалася виражена консолідація кісткового дефекту.

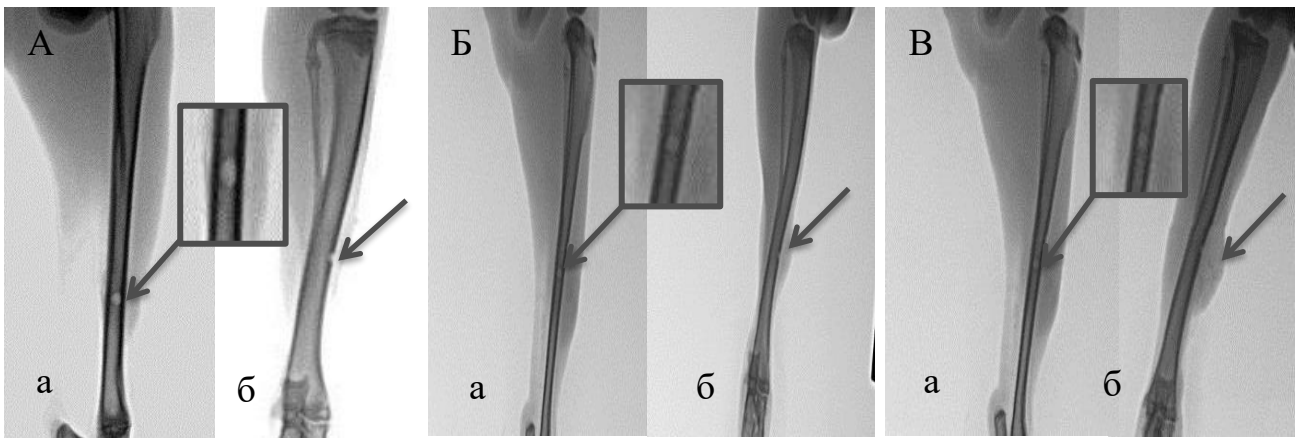


Рис. 1. Місце дефекту великогомілкової кістки у кролів на 7 добу експерименту: А – контрольна група; Б – I дослідна група; В – II дослідна група; а – бокова проекція; б – пряма проекція

На 14 добу експерименту у кролів контрольної групи спостерігали ще добре виражену реакцію з боку прилеглих м'яких тканин, з'явилися ознаки кісткового мозоля, діаметр і глибина дефекту зменшилися. Спостерігалася консолідація кісткового дефекту (рис. 2 А). У кролів I дослідної групи спостерігали зниження реакції з боку прилеглих м'яких тканин, виражені ознаки кісткового мозоля, зменшення діаметра і глибини дефекту (рис. 2 Б). Відбувалася виражена консолідація кісткового дефекту. У кролів II дослідної групи помічали зниження реакції з боку прилеглих м'яких тканин, добре

виражений кістковий мозоль, який зменшувався в об'ємі, та зменшення діаметра і глибини дефекту (рис. 2 В). Спостерігалось продовження консолидації кісткового дефекту.

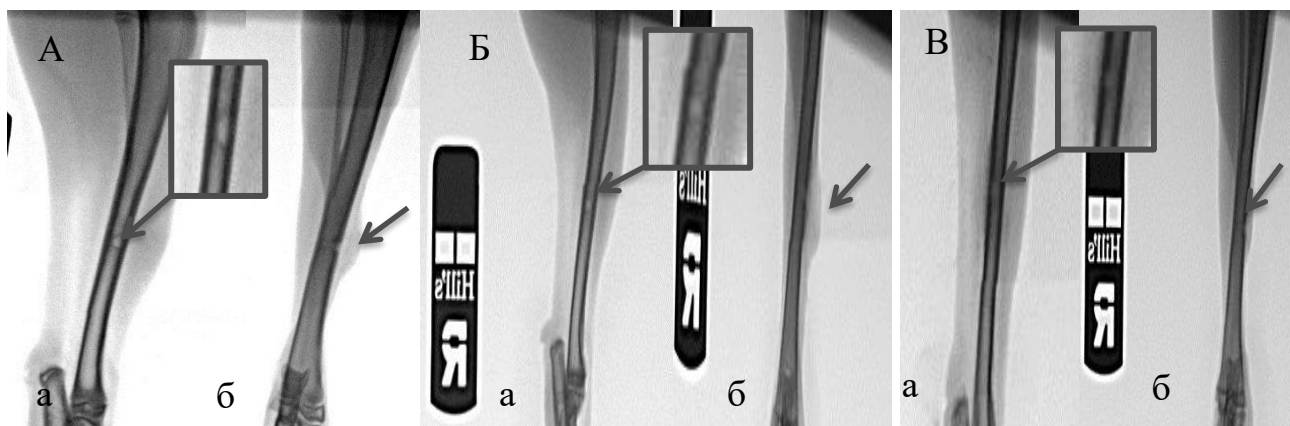


Рис. 2. Місце дефекту великогомілкової кістки у кролів на 14 добу експерименту: А – контрольна група; Б – I дослідна група; В – II дослідна група; а – бокова проекція; б – пряма проекція

На 21 добу експерименту у кролів контрольної групи відмічалось незначне зменшення реакції з боку прилеглих м'яких тканин, добре виражений кістковий мозоль, який зменшувався в об'ємі, та зменшення діаметра і глибини дефекту. Відбувалася виражена консолидація кісткового дефекту. У кролів I дослідної групи спостерігали зменшення діаметра дефекту, незначну реакцію з боку прилеглих м'яких тканин, зменшення кісткового мозоля в об'ємі. Продовжувалася виражена консолидація кісткового дефекту. У кролів II дослідної групи спостерігали зменшення діаметра і глибини дефекту. Реакція з боку прилеглих м'яких тканин була незначною. Відмічали зменшення об'єму й ущільнення кісткового мозоля. Продовжувалася виражена консолидація кісткового дефекту.

На 28 добу експерименту у кролів контрольної групи спостерігали зменшення діаметра і глибини дефекту, незначну реакцію з боку прилеглих м'яких тканин, зменшення та ущільнення кісткового мозоля. Консолидація кісткового дефекту продовжувалася (рис. 3 А). У кролів I дослідної групи вже не відмічали реакцію з боку прилеглих м'яких тканин, відбувалося зменшення об'єму й ущільнення кісткового мозоля, консолидація кісткового дефекту, а округлий дефект практично не візуалізується (рис. 3 Б). У кролів II дослідної групи спостерігали відсутність реакції з боку прилеглих м'яких тканин, круглий дефект вже практично не візуалізується, кістковий мозоль зменшився в об'ємі й ущільнився до кісткової тканини. Відбулася консолидація кісткового дефекту (рис. 3 В).

Отже, за показниками рентгенологічного дослідження у тварин I та II дослідних груп на 28 добу експерименту зафіксовано завершення процесів репаративної регенерації кісткової тканини в зоні експериментального її ушкодження.

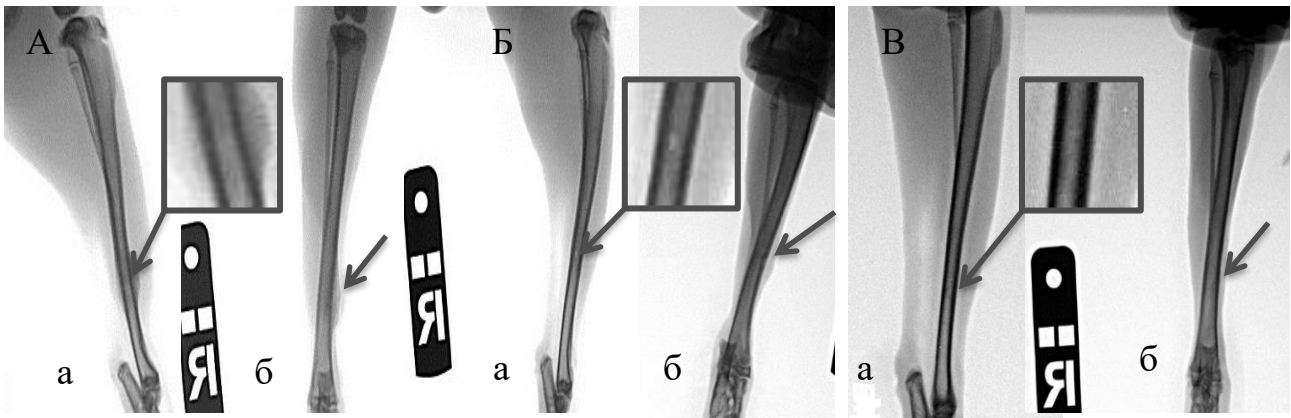


Рис. 3. Місце дефекту великогомілкової кістки у кролів на 28 добу експерименту: А – контрольна група; Б – I дослідна група; В – II дослідна група; а – бокова проекція; б – пряма проекція

На 42 добу експерименту у кролів I і II дослідних груп видимих ознак місця дефекту не спостерігалось, округлий дефект вже не візуалізується (рис. 4 Б, В). У тварин контрольної групи зміни в зоні нанесення дефекту були аналогічними, як і у тварин I та II дослідних груп на 28 добу експерименту, а саме спостерігали відсутність реакції з боку прилеглих м'яких тканин, округлий дефект практично не візуалізується, кістковий мозоль зменшився в об'ємі й ущільнився до кісткової тканини (рис. 4 А). Відбулася консолідація кісткового дефекту.

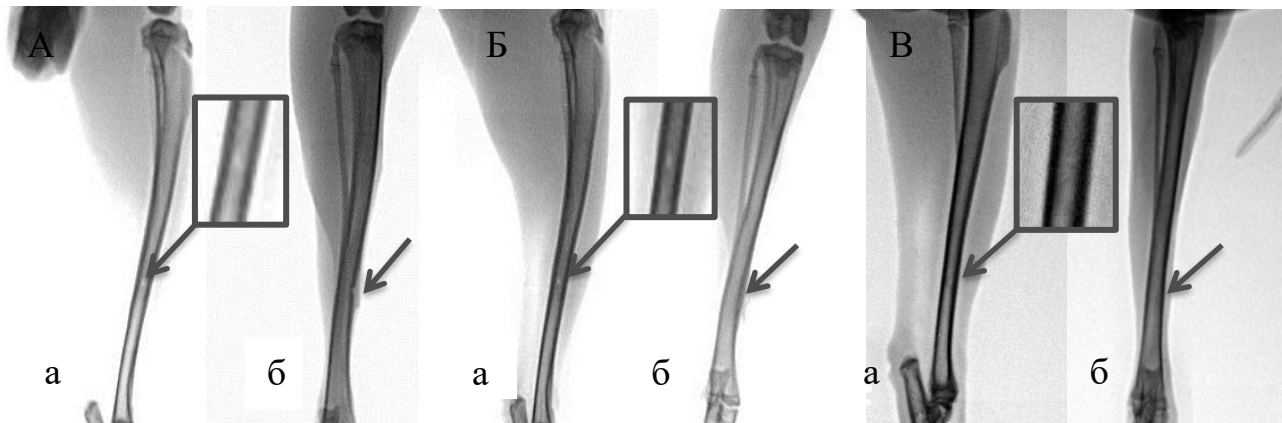


Рис. 4. Місце дефекту великогомілкової кістки у кролів на 42 добу експерименту: А – контрольна група; Б – I дослідна група; В – II дослідна група; а – бокова проекція; б – пряма проекція

Отже, встановлено, що після введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у кровоносне русло та у місце дефекту процеси регенерації завершуються практично на 28 добу, за рахунок прискорення фаз репаративного остеогенезу. За цих умов швидше розвивається і зникає реакція з боку прилеглих м'яких тканин, утворюється кістковий мозоль, який швидше ущільнюється до кістки, прискорюються процеси консолідації кісткового дефекту.

Відзначено, що більш активно регенеративні процеси в місці дефекту протікають у тварин II дослідної групи за введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у місце експериментального ушкодження кісткової тканини, на що вказують, зокрема більш інтенсивний розвиток реакції з боку прилеглих м'яких тканин, утворення кісткового мозоля, консолідація кісткового дефекту.

Макроскопічні зміни у великогомілковій кістці. На 3 добу експерименту у кролів контрольної групи виявляли дефект кістки округлої форми, наявність згустків крові у місці дефекту, характерних для першої стадії запалення – альтерації. Інших змін не спостерігалось. У кролів I дослідної групи відмічалася незначна припухлість м'яких тканин та відсутність згустків крові у місці дефекту та початок формування кісткового мозоля. У кролів II дослідної групи виявляли дефект кістки округлої форми, заповнений рожевою тканиною, яка виходила із кістково-мозкового каналу. Також спостерігали незначну припухлість м'яких тканин і початок утворення кісткового мозоля, який частково закривав кістковий дефект.

На 7 добу експерименту у кролів контрольної групи відмічалася незначна припухлість м'яких тканин, формування кісткового мозоля, наявність незначної кількості згустків крові у місці дефекту (рис. 5 а). У кролів I дослідної групи відмічали виражену припухлість м'яких тканин, ознаки утворення кісткового мозоля, який частково закривав кістковий дефект (рис. 5 б). У кролів II дослідної групи спостерігали виражену припухлість м'яких тканин, виражені ознаки добре сформованого кісткового мозоля, який повністю закривав кістковий дефект (рис. 5 в).

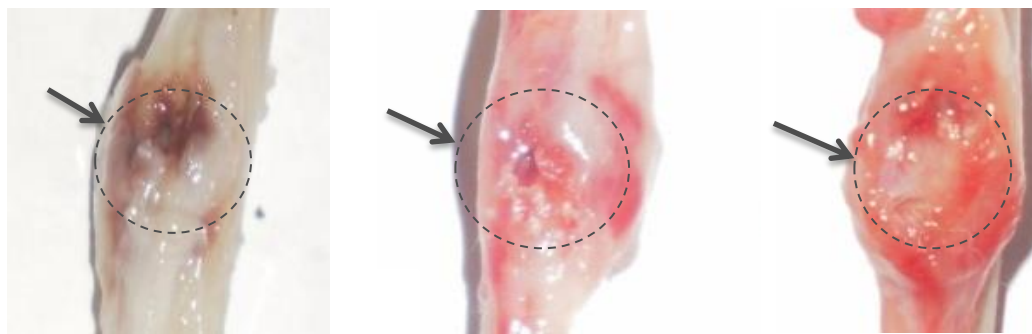


Рис. 5. Місце дефекту великогомілкової кістки кролів на 7 добу експерименту (показано стрілкою): а – контрольна група; б – I дослідна група; в – II дослідна група

На 14 добу експерименту у кролів контрольної групи відмічалася виражена припухлість м'яких тканин, утворення кісткового мозоля, який ще не повністю закривав кістковий дефект (рис. 6 а).

У кролів I дослідної групи виявлено зменшення припухлості м'яких тканин, чітко виражений кістковий мозоль, який повністю закривав кістковий дефект (рис. 6 б). У кролів II дослідної групи спостерігали зниження припухлості м'яких тканин, добре виражений кістковий мозоль, який зменшився в об'ємі (рис. 6 в).



Рис. 6. Місце дефекту великогомілкової кістки кролів на 14 добу експерименту (показано стрілкою): а – контрольна група; б – I дослідна група; в – II дослідна група

На 21 добу експерименту у кролів контрольної групи відмічали зменшення припухлості м'яких тканин та виражений кістковий мозоль, який повністю закривав кістковий дефект. У кролів I дослідної групи спостерігали ще незначну припухлість м'яких тканин і зменшення мозоля в об'ємі. У кролів II дослідної групи спостерігали незначну припухлість м'яких тканин, а кістковий мозоль мав значно менші розміри, ніж у кролів I дослідної групи.

На 28 добу експерименту у кролів контрольної групи спостерігали незначну припухлість м'яких тканин та зменшення мозоля в об'ємі (рис. 7 а). У кролів I дослідної групи виявляли відсутність припухлості м'яких тканин, кістковий мозоль зменшився в об'ємі і ущільнився до кістки, був майже не помітний (рис. 7 б). У кролів II дослідної групи ознаки загоювання були подібні до таких, як у тварин I дослідної групи, де спостерігали відсутність припухлості м'яких тканин, а кістковий мозоль зменшився в об'ємі і був уже непомітний (рис. 7 в).

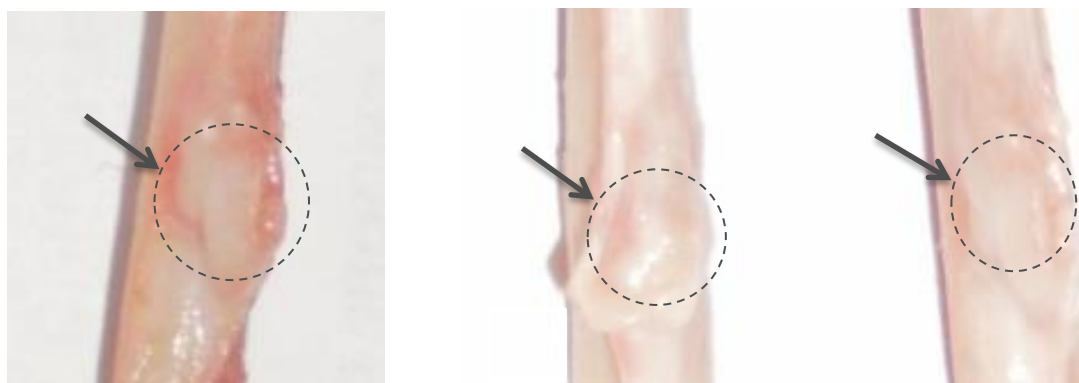


Рис. 7. Місце дефекту великогомілкової кістки кролів на 28 добу експерименту (показано стрілкою): а – контрольна група; б – I дослідна група; в – II дослідна група

На 42 добу у кролів I та II дослідних груп видимих ознак місця дефекту не виявлено. У кролів контрольної групи припухлість м'яких тканин не відмічалася, кістковий мозоль зменшився в об'ємі до кістки і був майже непомітний (рис. 8).

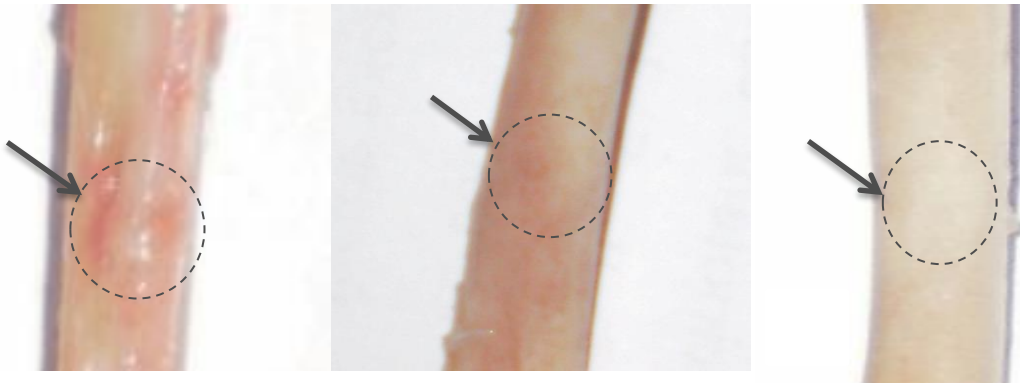


Рис. 8. Місце дефекту великогомілкової кістки кролів на 42 добу експерименту (показано стрілкою): а – контрольна група; б – I дослідна група; в – II дослідна група

Отже, аналіз показників макроскопічного дослідження етапів відновлення дефекту великогомілкової кістки свідчить, що у кролів I та II дослідних груп, на відміну від кролів контрольної групи, процеси регенерації проходять швидше, вже на 3 добу в зоні ушкодження відсутні згустки крові, а в наступні фази регенеративного остеогенезу реакції прилеглих м'яких тканин, утворення кісткового мозоля і зменшення його в об'ємі прискорені. Практично повне відновлення дефекту у кролів дослідних груп відбувається на 28 добу, проте у тварин контрольної групи – лише на 42 добу експерименту.

Порівняння ефективності застосування двох способів введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин показало, що після застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин безпосередньо в місце ушкодження процеси регенерації в ділянці створеного дефекту кістки більш інтенсивно виражені в першу та подальші фази регенерації, ніж у тварин після застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин внутрішньовенно.

Гістологічні дослідження. Мікроскопічні зміни в експериментально ушкодженій кістковій тканині у кролів контрольної групи. На 3 добу експерименту місце дефекту закрито випинанням кісткового мозку, в якому виявляються уламки кісткової тканини та згустки з елементів крові. В прилеглому до ділянки дефекту кістковому мозку теж реєструвалася велика кількість клітин крові. Кістковий мозок поблизу місця дефекту інфільтрований великою кількістю зрілих еритроцитів, серед яких виявлялися недиференційовані клітини.

На 7 добу експерименту місце дефекту з боку окістя вже частково заповнене компактною кістковою тканиною, яка ще не набула типової мікроскопічної будови, а в кістковому мозку збоку, навпроти та в самому місці дефекту реєстрували розростання волокнистої сполучної тканини. В місці дефекту та по боках від нього реєструвався інтенсивний остеогенез, а в кістковому мозку поблизу місця дефекту зареєстрована виразна проліферація незрілих клітин і поодиноких мегакаріоцитів. Від місця дефекту до протилежної йому частини кісткової трубки через увесь кістковий мозок перпендикулярно до місця дефекту проходять тяжі щільної волокнистої

сполучної тканини. Віддалено від місця дефекту в кістковому мозку реєстрували розширення й переповнення кров'ю кровоносних капілярів.

На 14 добу експерименту місце дефекту вже повністю заповнене новоутвореною кістковою тканиною, мікроскопічна будова якої подібна до мікроскопічної будови компактної кістки. На відміну від типових остеонів компактної кістки, пластинки в остеоноподібних структурах новоутвореної кістки слабо диференційовані, остецити розташовувалися нерівномірно, а орієнтація новоутворених остеонів не впорядкована. На зовнішній поверхні трубчастої кістки в місці дефекту відмічено формування хрящового кісткового мозоля, який містив велику кількість міжклітинної речовини, недиференційованих клітин і фібробластів.

На 21 добу експерименту на поверхні кістки у місці дефекту виявлявся кістковий мозоль. Його зовнішній шар представлений щільною волокнистою сполучною тканиною. У внутрішній ділянці кісткового мозоля, що прилягає до зовнішньої поверхні новоутвореної кістки, реєструвалися інтенсивні процеси остеогенезу. У кістковому мозку поблизу місця дефекту реєструвалися поодинокі невеликі вогнища проліферації незрілих клітин і процеси остеогенезу. Мікроскопічні зміни новоутвореної кісткової тканини в місці дефекту аналогічні таким, як на 14 добу.

На 28 добу експерименту кістковий мозоль помітно зменшився у розмірах і побудований зі щільної волокнистої сполучної тканини. Крім того, в щільній волокнистій сполучній тканині, що вкривала цей мозоль, реєструвалися осередки кальцифікації. Місце дефекту повністю зарощене кістковою тканиною, яка ще не набула типової мікроскопічної будови. Зовнішня і внутрішня поверхня новоутвореної в місці дефекту кісткової тканини дещо нерівна. Тут все ще реєструвався виразний остеогенез.

На 42 добу експерименту кістковий мозоль ущільнився до кістки, а будова новоутвореної кістки подібна до типової мікроскопічної будови компактної кістки. В ній виявлялися поодинокі порожнини, де все ще відбувався остеогенез. Зовнішня поверхня новоутвореної кісткової тканини в місці дефекту нерівна. У кістковому мозку біля місця дефекту реєструвалися розширені й переповнені кров'ю кровоносні капіляри. Будь-які інші суттєві мікроскопічні зміни в цей період спостереження не були виявлені.

Отже, встановлено, що метод експериментального моделювання патологічного процесу великогомілкової кістки шляхом механічного ушкодження з чітко визначеними параметрами у кролів контрольної групи дозволяє прослідкувати всі фази репаративної регенерації кісткової тканини, починаючи з 3 доби, а практичне відновлення місця дефекту відбувається на 42 добу експерименту.

Мікроскопічні зміни в експериментально ушкодженій кістковій тканині у кролів I дослідної групи. На 3 добу експерименту місце дефекту закрито ретикулярною тканиною кісткового мозку. Клітин крові й уламків кісткової тканини в ділянці створеного дефекту та в прилеглому до нього кістковому мозку не виявлено, а в кістковому мозку збоку, навпроти та в самому місці дефекту, зареєстровано розростання волокнистої сполучної

тканини. У місці дефекту відмічено інтенсивне утворення кісткової тканини. Такі зміни за введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин сприяють значному підвищенню механічної міцності відновлювальної ділянки великогомілкової кістки.

На 7 добу експерименту місце дефекту на всю глибину частково зарощене кістковою тканиною. У місці дефекту реєструвався інтенсивний остеогенез. На зовнішній поверхні трубчастої кістки в місці дефекту спостерігали формування хрящового мозоля та реєстрували невеликі осередки остеогенезу. У кістковому мозку в місці створеного дефекту і поблизу від нього виявляли розширені, переповнені кров'ю кровоносні капіляри, виразне розростання волокнистої сполучної тканини та досить інтенсивний остеогенез.

На 14 добу експерименту місце дефекту вже повністю зарощене новоутвореною кісткою тканиною, мікроскопічна будова якої подібна до мікроскопічної будови губчастої кістки. На поверхні новоутвореної кісткової тканини в місці дефекту виявляли кістковий мозоль, представлений товстим шаром щільної волокнистої сполучної тканини. У прилеглому до місця дефекту кістковому мозку виявлено розростання волокнистої сполучної тканини та інтенсивний остеогенез з утворенням у цій ділянці кісткової тканини, яка простягалася від місця дефекту до протилежної йому стінки кістки.

На 21 добу експерименту місце дефекту повністю заповнене новоутвореною кістковою тканиною, мікроскопічна будова подібна до мікроскопічної будови компактної кістки, в якій вже виявлялися остеоноподібні структури. Проте ця новоутворена кісткова тканина ще містила великі порожнини різної форми. На поверхні кістки виявляли кістковий мозоль, мікроскопічна будова якого подібна до мікроскопічної будови компактної кістки. Зверху цей кістковий мозоль вкритий досить товстим шаром щільної волокнистої сполучної тканини. Мікроскопічна будова кісткового мозку в ділянці дефекту подібна до інтактного кісткового мозку.

На 28 добу експерименту місце дефекту повністю заповнене компактною кістковою тканиною, яка досить подібна до типової будови компактної кістки, проте ще містила досить широкі канали та мала невпорядковану мікроскопічну будову. Кістковий мозоль помітно зменшувався у розмірах і ущільнився до кістки.

На 42 добу експерименту кістковий мозоль не виявляли, новоутворена кісткова тканина в місці дефекту вже досить подібна до типової будови компактної кістки. В ній зустрічалися лише поодинокі порожнини. Будь-які інші суттєві мікроскопічні зміни в цей період спостереження не виявлено.

Проведені гістологічні дослідження показали, що після застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у яремну вену уламків кісткової тканини й клітин крові в ділянці створеного дефекту та в прилеглому до нього кістковому мозку на 3 добу експерименту не виявляли. Розростання волокнистої сполучної тканини та інтенсивний остеогенез в місці створеного дефекту кістки реєстрували вже на 3 добу, тоді як у кролів контрольної групи – на 7 добу експерименту. Формування хрящового кісткового мозоля виявляли вже на 7 добу, у кролів контрольної групи – на 14 добу експерименту.

Утворення кісткового мозоля встановлено на 14 добу, а у кролів контрольної групи – на 21 добу експерименту. Кістковий мозок набував нормальної будови на 21 добу, а у кролів контрольної групи – лише на 28 добу експерименту. Практичне відновлення місця дефекту відбулося на 28 добу, а у кролів контрольної групи – лише на 42 добу експерименту.

Мікроскопічні зміни в експериментально ушкодженій кістковій тканині кролів II дослідної групи. На 3 добу експерименту місце дефекту вже заповнене новоутвореною волокнистою сполучною тканиною, в якій виявлялася відносно невелика кількість пучків колагенових волокон і вже реєструвався відносно інтенсивний остеогенез. Місце дефекту кістки із зовнішньої її поверхні вже прикривалося товстим шаром щільної волокнистої сполучної тканини. В кістковому мозку збоку та навпроти місця дефекту реєструвалося розростання волокнистої сполучної тканини.

На 7 добу експерименту в місці дефекту спостерігали виражені новоутворені осередки кісткової тканини, а місце дефекту вже вкрите добре вираженим хрящовим чи кістковим хрящовим мозолем, який прикривався товстим шаром щільної волокнистої сполучної тканини.

На 14 добу експерименту на зовнішній поверхні кістки виявляли кістковий мозоль, вкритий товстим шаром щільної волокнистої сполучної тканини, який був добре вираженим.

На 21 добу експерименту зміни в місці створеного дефекту були подібними до таких, як у цей же термін спостереження у кролів I дослідної групи. Лише кістковий мозоль мав значно менші розміри і ущільнювався до кісткової тканини.

На 28 добу експерименту відмічали досить виразні ознаки резорбції остеокластами кісткового мозоля, який ущільнився до кістки.

На 42 добу експерименту мікроскопічні зміни в ділянці дефекту були повністю аналогічні таким, як у цей же термін спостереження у тварин I дослідної групи. Будь-які інші суттєві мікроскопічні зміни в цей період спостереження не виявлені.

Проведені гістологічні дослідження вказують на те, що динаміка розвитку мікроскопічних змін у ділянці створеного дефекту кістки у кролів II дослідної групи, яким вводили алогенні мезенхімальні стовбурові клітини в місце дефекту загалом була подібною до такої, як і у кролів I дослідної групи, яким вводили алогенні мезенхімальні стовбурові клітини у яремну вену.

Основною відмінністю було те, що тваринам після застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у місце дефекту, вже на 3 добу експерименту дефект кістки був заповнений переважно новоутвореною волокнистою сполучною тканиною, а місце ушкодження кістки із зовнішньої її поверхні прикривалося досить товстим шаром щільної волокнистої сполучної тканини, що має велике значення для консолідації тканин кісткового дефекту саме у першу фазу репаративного остеогенезу.

Отже, введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у яремну вену і безпосередньо в зону ушкодження підвищує активність регенеративних процесів і прискорює фази репаративного остеогенезу в зоні дефекту. За цих

умов відновлення дефекту практично завершується вже на 28 добу дослідження, тимчасом як у тварин контрольної групи на 42 добу експерименту. Встановлено, що за введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин безпосередньо в місце експериментального ушкодження кісткової тканини процеси відновлення на всіх фазах репаративної регенерації більш інтенсивно виражені, ніж після введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у яремну вену.

Динаміка біохімічних змін у сироватці крові кролів. Загальну реакцію організму дослідних тварин на експериментальне ушкодження кісткової тканини можна прослідкувати за зміною біохімічних показників крові. Встановлено, що у вихідному стані досліджувані біохімічні показники сироватки крові у кролів дослідної групи не виходили за межі фізіологічних параметрів. Так, вміст Кальцію становив 2,87 ммоль/л, Фосфору – 2,46 ммоль/л, активність лужної фосфатази – 90 Од/л.

На 3 добу експерименту у кролів контрольної групи, порівняно з інтактними тваринами, виявляли вірогідне зменшення вмісту Кальцію на 15 %, що, очевидно, є наслідком втрати основного елемента кістки після нанесення дефекту. Одночасно реєстрували вірогідне зростання активності лужної фосфатази на 30 %. Як відомо, цей фермент є мембранозв'язаним і знаходиться на поверхні остеобластів, тому таке зростання його активності можна пояснити руйнуванням остеобластів у зоні травми та елімінацією в кровоносне русло. Початок запального процесу в місці ушкодження.

У кролів I дослідної групи, порівняно з кролями контрольної групи, вміст Кальцію достовірно збільшився на 43 %. Одночасно зареєстровано достовірне зменшення Фосфору на 13 % та активності лужної фосфатази на 29 %, що, очевидно, є наслідком резорбції загиблої тканини з дезінтеграцією та деградацією оточуючих структур, які входять до складу кістки, а також зростанням інтенсивності проліферативних процесів у місці ушкодження. У кролів II дослідної групи, порівняно з кролями контрольної групи, вміст Кальцію достовірно збільшився на 47 %, а активність лужної фосфатази достовірно знизилася на 27 %. Такі зміни є наслідком інтенсивної резорбції загиблої тканини з дезінтеграцією та деградацією оточуючих структур, які входять до складу кістки та зростанням інтенсивності проліферативних процесів у місці ушкодження.

На 7 добу експерименту у кролів контрольної групи, порівняно з інтактними тваринами, вміст Кальцію та Фосфору в сироватці крові вірогідно збільшився на 7 та 6 %, а активність лужної фосфатази вірогідно збільшилася на 14 %, що є показником резорбції загиблої тканини з дезінтеграцією та деградацією оточуючих структур, які входять до складу кістки, та початком проліферативних процесів у місці ушкодження.

У кролів I дослідної групи, порівняно з тваринами контрольної групи, активність лужної фосфатази достовірно зросла на 38 %, що співпадає із початком формування кісткового мозоля та стимулювання інтенсивного остеогенезу. У кролів II дослідної групи, порівняно з тваринами контрольної групи, вміст Кальцію достовірно знизився на 14 %, активність лужної

фосфатази достовірно підвищилася у 2,1 раз, що вказує на більш інтенсивне формування тканинспецифічних елементів кістки і мобілізацію макроелемента для забезпечення цих процесів та утворення кісткового мозоля.

На 14 добу експерименту у кролів контрольної групи, порівняно з інтактними тваринами, вміст Кальцію вірогідно збільшився на 21 %, вміст Фосфору вірогідно зменшився на 15 %, активність лужної фосфатази вірогідно підвищилася у 3,6 раз. Такі зміни свідчать про формування кісткового мозоля і мобілізацію макроелементів для забезпечення тканинспецифічних елементів кістки.

У кролів I дослідної групи, порівняно з тваринами контрольної групи, вміст Кальцію достовірно зменшився на 15 %, вміст Фосфору достовірно збільшився на 32 %, активність лужної фосфатази достовірно знизилася на 47 %. Такі зміни свідчать про процеси осифікації в ділянці ушкодженої структурної організації кістки та певну стадійність перебудови у кістковій тканині і кістковому мозолі в місці дефекту. У кролів II дослідної групи, порівняно з тваринами контрольної групи, вміст Кальцію достовірно зменшився на 14 %, вміст Фосфору достовірно збільшився на 25 %, активність лужної фосфатази достовірно знизилася на 47 %. Такі зміни свідчать про схожість процесів, які відбуваються у тварин I дослідної групи в цей період досліджень, проте відрізняються інтенсивнішими ознаками перебігу.

На 21 добу експерименту у кролів контрольної групи активність лужної фосфатази різко знижується порівняно з 14 добою, але порівняно з інтактними тваринами в цей період була вірогідно вища на 32 %. Такі зміни свідчать про початок осифікації в ділянці ушкодженої структурної організації кістки та перебудову кісткового мозоля. У кролів I дослідної групи, порівняно з тваринами контрольної групи, активність лужної фосфатази достовірно знизилася на 28 %, що свідчить про зменшення кісткового мозоля та ремоделювання регенерату. Водночас, у кролів II дослідної групи відбувалися такі ж процеси, як і у кролів I дослідної групи, проте, більш інтенсивно виражені.

На 28 добу експерименту у кролів контрольної групи, порівняно з інтактними тваринами, вміст Кальцію вірогідно збільшився на 13 %, вміст Фосфору вірогідно зменшився на 19 %, активність лужної фосфатази вірогідно підвищилася на 35 %, що може свідчити про зменшення кісткового мозоля та ремоделювання регенерату.

У кролів I дослідної групи біохімічні показники сироватки крові на 28 добу експерименту наближалися до показників у інтактних тварин, і порівняно з кролями контрольної групи, вміст Фосфору достовірно збільшився на 13 %, активність лужної фосфатази достовірно знизилася на 28 %. У кролів II дослідної групи біохімічні показники були подібними до показників у кролів I дослідної групи та наближалися до показників інтактних тварин. Щодо кролів контрольної групи, вміст Кальцію достовірно знизився на 20 %, вміст Фосфору достовірно збільшився на 17 %, а активність лужної фосфатази достовірно знизилася на 20 %. Такі біохімічні зміни у кролів I і II дослідних груп свідчать

про зменшення кісткового мозоля, зміцнення новоутвореної кістки та завершення процесів регенерації у місці дефекту.

Отже, динаміка вмісту Кальцію, Фосфору та активності лужної фосфатази у сироватці крові кролів є характерною для перебігу репаративного остеогенезу і може бути прогностичним критерієм процесів остеорепарації травмованої кістки.

Такі біохімічні зміни в процесі відновлення дефекту у дослідних груп, на відміну від контрольної групи тварин, очевидно, відбуваються у зв'язку із швидшим формуванням тканиноспецифічних елементів кістки і мобілізацією макроелементів для забезпечення цих процесів, формуванням кісткового мозоля та інтенсивним остеогенезом, що є ознакою швидшого розвитку відновлювальних процесів у пошкодженій кістці. У кролів II дослідної групи, на відміну від кролів I дослідної групи, зміни показників вмісту Кальцію і Фосфору та активності лужної фосфатази свідчать про інтенсивніше виражені процеси регенерації у кістковій тканині.

ВИСНОВКИ

У дисертації представлено узагальнення та нове вирішення наукового завдання, яке полягає у вивченні особливостей перебігу процесів відновлення експериментально ушкодженої кісткової тканини за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин, введених в організм тварин-реципієнтів різними способами. Доведено, що трансплантовані алогенні мезенхімальні стовбурові клітини підвищують активність регенеративних процесів і прискорюють фази репаративного остеогенезу в зоні дефекту, де за цих умов відновлення дефекту практично завершується вже на 28 добу дослідження, в той час як у тварин контрольної групи на 42 добу.

1. На 3 добу досліджень у тварин I та II дослідних груп за введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин розвивається перша фаза репаративної регенерації у вигляді першої і другої та початку третьої стадії запалення – проліферації з розростанням волокнистої сполучної тканини у місці дефекту, інтенсивним остеогенезом і незначною припухлістю м'яких тканин; у тварин контрольної групи зафіксовано лише першу та другу стадію запалення (альтерація і судинна реакція з ексудацією), наявність уламків кісткової тканини в стані деструкції, згустків крові в місці дефекту і розширення кровоносних судин.

2. На 7 добу досліджень у тварин I та II дослідних груп зареєстровано другу фазу репаративної регенерації – диференціація: формування тканиноспецифічних структур у ділянці травми, інтенсивний остеогенез із частковим заповненням місця дефекту кістковою тканиною, утворення хрящового кісткового мозоля, зменшення об'єму округлого дефекту та виражена припухлість прилеглих м'яких тканин; у тварин контрольної групи встановлено лише третю стадію запалення – проліферацію з розростанням волокнистої сполучної тканини у місці дефекту, інтенсивним остеогенезом, незначною припухлістю м'яких тканин.

3. На 14 добу досліджень у тварин I та II дослідних груп зафіксовано розвиток третьої фази репаративної регенерації – реорганізація: утворення кісткового мозоля, який повністю закривав місце дефекту, зменшення в об'ємі дефекту, заповненого новоутвореною кістковою тканиною, та зниження припухлості прилеглих м'яких тканин; у тварин контрольної групи зареєстровано другу стадію репаративної регенерації – диференціація з диференціюванням клітин і формуванням тканиноспецифічних структур у ділянці травми.

4. На 21 добу досліджень у тварин I та II дослідних груп відмічено розвиток четвертої фази репаративної регенерації – ремоделювання: кістковий мозок набуває нормальної будови, залишається незначна припухлість прилеглих м'яких тканин, зменшення мозоля в об'ємі, будова якого подібна до будови компактної кістки; у тварин контрольної групи виявлено лише третю фазу репаративної регенерації – реорганізація: реорганізація тканинних структур і їх мінералізація.

5. На 28 добу досліджень у тварин I та II дослідних групи виявлено розвиток п'ятої фази репаративної регенерації – завершення: відновлення форми і функції кісткової тканини, на що вказують відсутність припухлості прилеглих м'яких тканин, ущільнення кісткового мозоля до кістки, новоутворена в місці дефекту кістка подібна до компактної кістки, а місце дефекту практично не візуалізується; у тварин контрольної групи відмічено лише четверту фазу репаративної регенерації – ремоделювання: інтеграція і адаптація кісткового регенерату.

6. На 42 добу досліджень у тварин I та II дослідних груп будь-яких суттєвих змін у цей період спостереження не виявлено, місце дефекту не візуалізується, новоутворена кісткова тканина подібна до типової будови компактної кістки; у тварин контрольної групи зафіксовано п'яту фазу – завершення: відновлення форми і функції кісткової тканини.

7. У тварин з експериментальним ушкодженням кісткової тканини зареєстровано реакцію цілісного організму на місцеве ушкодження протягом всього періоду спостережень, на що вказує динаміка вмісту Кальцію, Фосфору та активності лужної фосфатази в сироватці крові. Біохімічні зміни в процесі відновлення дефекту у тварин обох дослідних груп, на відміну від тварин контрольної групи, свідчать про інтенсивніший розвиток відновлювальних процесів у пошкодженій великогомілковій кістці.

8. За введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин безпосередньо у місце експериментального ушкодження кісткової тканини процеси відновлення на всіх фазах репаративної регенерації більш інтенсивно виражені, ніж після введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у яремну вену: вже починаючи з 3 доби експерименту, дефект заповнений переважно новоутвореною волокнистою сполучною тканиною, місце ушкодження кістки прикривається досить товстим шаром щільної волокнистої сполучної тканини та відбувається інтенсивніша стимуляція остеогенезу, що має велике значення саме в цей період для консолідації тканини кісткового дефекту.

9. Експериментальне моделювання патологічного процесу великогомілкової кістки шляхом механічного ушкодження з чітко визначеними параметрами дозволяє прослідкувати фази репаративної регенерації кісткової тканини за природних умов та отримати вірогідні результати у вивченні ефективності застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин для стимуляції процесів репаративного остеогенезу у кістці.

10. Вдосконалення способу прижиттєвого отримання кісткового мозку у дрібних тварин дозволяє створити асептичні умови в процесі відбору біоптату та дає змогу знизити травматизм оточуючих тканин.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Результати проведених досліджень пропонуються до використання в науковій і навчальній роботі з метою подальшого вивчення впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на процеси регенерації в ушкоджених тканинах, а також у клінічній практиці, як один із додаткових методів лікування тварин із травматичними дефектами кісткової тканини.

2. Рекомендується використовувати у клінічній практиці ветеринарної медицини «Спосіб прижиттєвого отримання кісткового мозку у дрібних тварин», як низькотравматичний, безпечний і простий у виконанні (*патент України на корисну модель № 118262 від 25.07.2017 р.*).

3. Результати досліджень увійшли до науково-методичних рекомендацій «Методи видоспецифічної оцінки стовбурових клітин та їх застосування у ветеринарній клітинній регенеративній терапії» (*затверджено Вченою радою Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 5 від 27.12.2017 р.*), які можуть використовуватися у науково-дослідних закладах і профільних установах ветеринарної медицини для вивчення впливу стовбурових клітин на процеси регенерації у тканинах.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Савчук Т. Л. Зміна біохімічних показників крові кролів після експериментального ушкодження кісткової тканини. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин НААН (сільськогосподарські та ветеринарні науки). 2017. Вип. 18. № 1. С. 70–75.

2. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Харкевич Ю. О., Савчук Т. Л. Гістологічні зміни у кістковому мозку за експериментального ушкодження кісткової тканини. Вісник Полтавської державної аграрної академії. 2017. № 4 (87). С. 89–94. (*Здобувачем проведено дослідження мікроскопічних змін у кістковому мозку, здійснено аналіз результатів та підготовлено статтю*).

3. Савчук Т. Л. Рентгенологічні зміни у кістці за її експериментального ушкодження на фоні введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у кровоносне русло. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок і

Інституту біології тварин НААН (сільськогосподарські та ветеринарні науки). 2018. Вип. 19. № 1. С. 75–81.

**Статті у наукових фахових виданнях України,
включених до міжнародних наукометричних баз даних:**

4. **Савчук Т. Л.,** Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Данілов В. Б. Гістологічні зміни в кістковій тканині при експериментальному механічному ушкодженні. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2017. № 273. С. 146–157. *(Здобувачем проведено дослідження мікроскопічних змін у кістковій тканині, здійснено аналіз результатів та підготовлено статтю).*

5. **Савчук Т. Л.,** Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Ткаченко В. В., Гулякова О. Г. Рентгенологічні зміни у кістці за експериментального ушкодження та після ведення аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин. Науковий вісник ветеринарної медицини. 2017. № 2 (136). С. 106–113. *(Здобувачем проведено дослідження рентген знімків великогомілкової кістки, здійснено аналіз результатів та підготовлено статтю).*

6. **Савчук Т. Л.,** Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Харкевич Ю. О. Біохімічні зміни у сироватці крові кролів за експериментального механічного пошкодження кісткової тканини після застосування аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2018. № 285. С. 240–251. *(Здобувачем проведено біохімічні дослідження сироватки крові кролів, здійснено аналіз результатів та підготовлено статтю).*

Патент України на корисну модель

7. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Литвиненко Д. Ю., Харкевич Ю. О., **Савчук Т. Л.** Патент України на корисну модель № 118262. Спосіб прижиттєвого отримання кісткового мозку у дрібних тварин; заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України; № ц 2017 02492; заявлено 17.03.2017; опубліковано 25.07.2017; Бюл. № 14. *(Здобувачем взято участь у формуванні і дослідженні способу отримання кісткового мозку у дрібних тварин, підготовці матеріалів для патентування).*

Науково-методичні рекомендації

8. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Данілов В. Б., Стародуб Л. Ф., Ковпак В. В., Кладницька Л. В., Харкевич Ю. О., Бобось О. Л., Кляп Н. І., Бокотько Р. Р., **Савчук Т. Л.,** Ковпак О. С. Методи видоспецифічної оцінки стовбурових клітин та їх застосування у ветеринарній клітинній регенеративній терапії: [науково-методичні рекомендації]. К., 2017. 64 с. *(Затверджено Вченою радою Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 5 від 27 грудня 2017 року. Здобувачем проведено*

дослідження впливу стовбурових клітин на регенерацію кісткової тканини, підготовлено рекомендації до друку).

Тези наукових доповідей:

9. Савчук Т. Л., Мазуркевич А. Й., Малюк М. О. Зміна біохімічних показників крові кролів після експериментального ушкодження кісткової тканини. Досягнення та перспективи застосування гумінових речовин у сільському господарстві: Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 95-річчю Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету та 110-річчю від дня народження професора Л. А. Христевої, м. Дніпро, 19–20 жовтня 2017 року: тези доповіді. Дніпро, 2017. С. 113–114. *(Здобувачем проведено аналіз літературних даних, підготовлено матеріали до друку).*

10. Савчук Т. Л. Біохімічні зміни у сироватці крові кролів за експериментального механічного пошкодження кісткової тканини після застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин. Актуальні проблеми наук про життя та природокористування: IV Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених, м. Київ, 25–27 квітня 2018 року: тези доповіді. К., 2018. С. 120–123.

АНОТАЦІЯ

Савчук Т. Л. Регенеративні процеси в експериментально ушкодженій кістковій тканині кролів та вплив стовбурових клітин на їх стимуляцію. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2019.

У дисертації представлено узагальнення та нове вирішення наукового завдання щодо вивчення особливостей перебігу процесів відновлення експериментально ушкодженої кісткової тканини за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин, введених в організм тварин-реципієнтів різними способами.

Наведено результати досліджень макроскопічних, рентгенологічних, гістологічних і біохімічних змін (вміст Кальцію, Фосфору й активність лужної фосфатази) у сироватці крові кролів за експериментального механічного пошкодження кісткової тканини та впливу трансплантованих алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у яремну вену і безпосередньо у місце ушкодження.

Встановлено, що механічне ушкодження кісткової тканини спричинює виражену реакцію з боку кісткової тканини, прилеглих м'яких тканин та загальної реакції організму. За введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин спостерігається активізація та прискорення всіх фаз репаративного остеогенезу, починаючи вже з 3 доби, де за цих умов

відновлення дефекту практично завершується вже на 28 добу дослідження, тимчасом як у тварин контрольної групи на 42 добу.

Порівняння ефективності двох способів застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на репаративний остеогенез показало, що за введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин безпосередньо у місце експериментального ушкодження кісткової тканини процеси відновлення на всіх фазах репаративної регенерації більш інтенсивно виражені, ніж після введення їх у яремну вену, що має велике значення для консолідації тканини кісткового дефекту, саме на 3 добу досліджень.

Ключові слова: великогомілкова кістка, репаративний остеогенез, кісткова мозоль, кісткова тканина, алогенні мезенхімальні стовбурові клітини, рентгенівський знімок, лужна фосфатаза, Кальцій, Фосфор, остеоцит, остеобласт, фібробласт.

АННОТАЦІЯ

Савчук Т. Л. Регенеративные процессы в экспериментально поврежденной костной ткани кроликов и влияние стволовых клеток на их стимуляцию. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.02 «Патология, онкология и морфология животных». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2019.

В диссертации представлены обобщение и новое решение научного задания по изучению особенностей течения процессов восстановления экспериментально поврежденной костной ткани при влиянии аллогенных мезенхимальных стволовых клеток, введенных в организм животных-реципиентов в яремную вену (I опытная группа) и непосредственно в место экспериментального повреждения (II опытная группа).

Приведенные результаты исследований свидетельствуют о том, что механическое повреждение костной ткани в кроликов вызывает выраженную реакцию со стороны костной ткани, прилегающих мягких тканей и общей реакции организма.

Установлено, что при влиянии трансплантированных аллогенных мезенхимальных стволовых клеток у животных I и II опытных групп, уже на 3 сутки эксперимента регистрируется разрастание волокнистой соединительной ткани, отсутствие сгустков с клетками крови в месте дефекта, отмечается интенсивный остеогенез и сохраняется незначительная припухлость прилегающих мягких тканей. Такие изменения характерны для первой фазы репаративной регенерации в основе которой лежат воспалительные процессы в виде завершения воспаления второй и начале третьей стадии – пролиферации. У кроликов контрольной группы данные изменения наблюдали на 7 сутки эксперимента, и в этот период были зафиксированы лишь первая и вторая стадии воспаления (альтерация и сосудистая реакция с экссудацией), наличие

обломков костной ткани в состоянии деструкции, сгустков крови в месте дефекта и расширение кровеносных сосудов.

На 7 сутки эксперимента у животных I и II опытных групп отмечались формирование хрящевого костного мозоля, интенсивный остеогенез, уменьшение площади и объема округлого дефекта, а также выраженная отечность прилегающих мягких тканей, что характерно для развития второй фазы репаративной регенерации – дифференциация клеток и формированием тканеспецифических структур в области травмы. У кроликов контрольной группы данные изменения наблюдали только на 14 сутки эксперимента. На 14 сутки основного опыта у животных I и II опытных групп отмечены образование костной мозоли, зарастание места дефекта новообразованной костной тканью и уменьшение припухлости прилегающих мягких тканей, что характерно для развития третьей фазы репаративной регенерации – реорганизации тканевых структур и их минерализации, а у кроликов контрольной группы данные изменения наблюдали лишь на 21 сутки эксперимента.

На 21 сутки эксперимента у кроликов I и II опытных групп изменения в зоне повреждения характерны для развития четвертой фазы репаративной регенерации – ремоделирования: костный мозг приобретает нормальное строение, отмечается еще незначительная припухлость прилегающих мягких тканей, регистрируется уменьшение мозоли в объеме, ее микроскопическое строение приобретает микроскопическое строение компактной костной ткани. У кроликов контрольной группы данные изменения наблюдали лишь на 28 сутки эксперимента.

На 28 сутки основного опыта у кроликов I и II опытных групп отмечались изменения, характерные для развития пятой фазы репаративной регенерации – завершения, восстановления формы и функции кости: отсутствие припухлости прилегающих мягких тканей, строение места дефекта приближенно к микроскопическому строению компактной кости, костная мозоль уплотнилась до кости и была почти незаметна, а место дефекта уже почти не визуализировалось. У кроликов контрольной группы данные изменения наблюдали лишь на 42 сутки эксперимента.

На 42 сутки эксперимента у кроликов I и II опытных групп каких-либо существенных изменений в сравнении с 28 сутками опыта не отмечалось: место дефекта не визуализировалось, новообразованная костная ткань была подобна типичному строению компактной кости. У животных контрольной группы отмечены изменения, характерные для развития пятой фазы репаративной регенерации – завершения, восстановления формы и функции кости.

Сравнение эффективности двух способов применения аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на репаративный остеогенез показало, что при введении аллогенных мезенхимальных стволовых клеток непосредственно в место экспериментального повреждения костной ткани процессы восстановления на всех фазах репаративной регенерации более интенсивно выражены, чем после введения в яремную вену. В частности, начиная уже с 3 суток эксперимента, дефект заполнен преимущественно новообразованной

волокнистой соединительной тканью, место повреждения кости прикрыто достаточно толстым слоем плотной волокнистой соединительной ткани, происходила более интенсивная стимуляция остеогенеза, что имеет большое значение для консолидации ткани костного дефекта именно в этот период.

Таким образом, доказано, что аллогенные мезенхимальные стволовые клетки при введении в организм животных-реципиентов способствуют ускорению процессов регенерации костной ткани, начиная уже с 3 суток. При этих условиях восстановление дефекта практически завершается уже на 28 сутки исследования, в то время как у животных контрольной группы на 42 сутки. При этом при введении аллогенных мезенхимальных стволовых клеток непосредственно в место повреждения кости более эффективное, чем после введения их в кровеносное русло.

Ключевые слова: большеберцовая кость, репаративный остеогенез, костная мозоль, костная ткань, аллогенные мезенхимальные стволовые клетки, рентгеновский снимок, щелочная фосфатаза, Кальций, Фосфор, остецит, остеобласт, фибробласт.

ANNOTATION

Savchuk T. L. Regenerative processes in experimentally damaged bone tissue of rabbits and the influence of stem cells on their stimulation. – The Manuscript.

Thesis for the degree of candidate of veterinary sciences in the specialty 16.00.02 «Pathology, Oncology and Morphology of Animals». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2019.

The thesis presents a generalization and a new solution of the scientific task concerning the study of the peculiarities of the processes of restoration of experimentally damaged bone tissue due to the influence of allogeneic mesenchymal stem cells introduced into the organism of recipient animals in various ways.

The results of macroscopic studies, x-ray, histological and biochemical changes (the content of Calcium, Phosphorus and alkaline phosphatase activity) in the blood serum of rabbits in experimental mechanical damage to bone tissue and the influence of transplanted allogeneic mesenchymal stem cells in the jugular vein and directly into to the place damage.

It was found that mechanical damage to bone tissue causes a pronounced reaction from the bone tissue, adjacent soft tissues and the overall reaction of the body. During the introduction of allogeneic mesenchymal stem cells, activation and acceleration of all phases of reparative osteogenesis is observed, starting from the 3 day, where these conditions of defect restoration are almost completed on the 28 day of the study, while in animals of the control group on the 42 day.

Comparison of the effectiveness of two methods of using allogeneic mesenchymal stem cells for reparative osteogenesis showed that the introduction of allogeneic mesenchymal stem cells directly into the place of experimental bone tissue damage, the recovery processes at all phases of reparative regeneration are more pronounced than after the introduction into the jugular vein, which is of great

importance for the consolidation of bone defect tissue, namely on the 3 day of research.

Key words: tibia, reparative osteogenesis, bone marrow, bone tissue, allogeneic mesenchymal stem cells, x-ray, alkaline phosphatase, Calcium, Phosphorus, osteocyte, osteoblast, fibroblast.

Підписано до друку 18.03.19
Ум. друк. арк. 0,9
Наклад 100 прим.

Формат 60x84\16
Обл.-вид.арк. 0,9
Зам. № 190205

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041
тел.: 527-81-55

