

*Ю.В. МІНІН<sup>1</sup>, А.Ф. КАРАСЬ<sup>1</sup>, Г.А. КАРАСЬ<sup>1</sup>, С.П. ЧАЙКА<sup>1</sup>, П.А. ВІРИЧ<sup>1</sup>,  
Т.І. КУЧЕРЕНКО<sup>1</sup>, Н.С. ШУВАЛОВА<sup>1</sup>, Т.Я. РАСКАЛЄЙ<sup>2</sup>*

## **МОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ РЕПАРАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ В ЗОНІ ДЕФЕКТУ ХРЯЦОВОЇ ТКАНИНИ ЗОВНІШНЬОГО ВУХА КРОЛІВ ПІСЛЯ МІСЦЕВОГО ЗАСТОСУВАННЯ АЛОГЕННИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН**

*<sup>1</sup>Державна установа “Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка  
Національної академії медичних наук України”  
(дир. – акад. НАМН України, проф. Д.І. Заболотний)*

*<sup>2</sup>Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця  
(ректор – чл.-кор. НАМН України, проф. Ю.Л. Кучин)*

Галузь клітинної терапії належить до найбільш перспективних напрямків сучасної біомедицини, з практичним застосуванням якої цілком реальним може стати відновлення втраченої функціональної активності різноманітних органів і тканин в організмі людини [1].

Раціональне використання досягнень сучасної регенераційної медицини в оториноларингологічній практиці може забезпечити результативність низки лікувальних відновлювальних заходів при деструктивно-дегенеративних змінах тканин верхніх дихальних шляхів (ВДШ). Зокрема, враховуючи недостатню ефективність типової комплексної терапії при патологічних змінах та дефектах хрящової тканини верхніх дихальних шляхів існує нагальна потреба запровадження в практику лікування ЛОР-захворювань інноваційних розробок, які мають забезпечити стійкий результат та вагомий внесок у розвиток та удосконалення пластичних рино- та ларингологічних операцій, що надасть реальні перспективи підвищення ефективності лікування хворих [2, 3].

На сьогоднішній день спостерігається інтенсивне наукове обґрунтування можливості використання культивованих *in vitro*

клітин для відновлення порушеної функціональної активності тканин та ушкоджених органів. Використання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) є одним із найбільш перспективних напрямків регенеративної медицини. Вони широко застосовуються у якості матеріалу для клітинної терапії [4]. На цей час вже не викликає сумніву той факт, що в організмі людини відновлення тканин відбувається за рахунок стовбурових клітин, що являють собою резерв запасних недиференційованих попередників різноманітних типів клітинного матеріалу [5].

Увага багатьох дослідників спрямована на вивчення різноманітних характеристик МСК для забезпечення їх практичного використання в репаративній медицині. Враховуючи особливості даного типу клітин, а саме: наявність імунокоригуючої дії [6, 7], секреція великої кількості цитокінів та факторів росту [8], можливість диференціюватися не тільки в лінії клітин мезодермального ряду та міграції до осередку ураження [9], вони використовуються при різних патологіях як при аутологічній, так і при алогенній трансплантації [10-11].

Стимуляція регенерації хряща є актуальною проблемою для отоларингологів, тому що ціла низка патологічних станів

ВДШ пов'язана зі станом цієї тканини. Загальновідомо, що відновлення хрящової тканини ускладнюється через відсутність кровоносних судин та нервів. Оскільки живлення хондробластів і хондроцитів забезпечується шляхом дренажу поживних речовин з крові судин перихондрію, супутнє запалення перихондрію може унеможливити коректну трофіку хряща і сприяти виникненню патологічних змін в ньому. [12,13].

Актуальні питання практичного застосування клітинної терапії пов'язані з джерелом отримання, методикою культивування та способом застосування мезенхімальних стовбурових клітин, вивченням їх морфологічних ознак активації регенеративних процесів. Зважаючи на це, доцільним є подальше вивчення в експерименті ефективності застосування мезенхімальних стовбурових клітин при їх системному та місцевому використанні для стимуляції регенеративних процесів в організмі людини

**Метою даної роботи** є вивчення особливостей відновлення еластичної хрящової тканини зовнішнього вуха кролів в зоні дефекту після його заповнення алогенними МСК з використанням методів морфології та морфометрії

### **Матеріал та методи**

Дослідження були проведені на 24 статевозрілих кролях породи шиншила, обох статей, віком від 1,5 до 3 місяців та масою (2,5-4,0) кг. розведення віварію Державної установи «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка Національної академії медичних наук України». Тварин утримували у віварії в стандартних клітках та забезпечували необхідний харчовий раціон. Всі експериментальні роботи проводили з дотриманням заходів забезпечення бережливого та гуманного поводження з тваринами у відповідності до установ Конвенції Ради Європи про положення біомедицини та відповідних Законів України, а також за узгодженням з комітетом медичної етики Державної установи «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка Національної академії медичних наук України».

Вивчення репаративних процесів хрящової тканини зовнішнього вуха кролів

в зоні стандартизованого лінійного дефекту у вигляді щілини шириною 2-3 мм та довжиною 7-8 мм проведено на 2 групах тварин. При цьому 1-а група була дослідною (15 кролів), 2-а (9 кролів) – контрольною. В контрольній групі тварин проводили операцію по створенню дефекту з видаленням хрящової тканини зі збереженням охрястя, яким його закривали. В дослідній групі проводили таку ж операцію, заповнювали дефект суспензією МСК в кількості 5 млн клітин та аналогічно закривали збереженим фрагментом охрястя. МСК виділяли з пупкового канатика кролів ферментативним методом. Після першого пасажу отримані культури МСК перевірялись щодо здатності до диференціації та відповідності їх стовбурового потенціалу.

При маніпуляціях тварини перебували під загальною анестезією комбінацією препаратів (дексмедетомідин 0,25 мг/кг + кетамін 35 мг/кг згідно рекомендацій ULAM Rabbit Anesthesia and Analgesia Guidelines [14].

Матеріал для дослідження забирали через 1, 2 та 3 місяці після хірургічного втручання.

Зразки еластичного хряща вуха кролів для подальших досліджень вирізали скальпелем разом з оточуючим нативним хрящем, переносили у фізіологічний розчин, очищали від шкіри та залишків крові. Гістологічні зрізи готували на кріостаті НМ-525 при  $t = -30^{\circ}\text{C}$  перпендикулярно площині хряща товщиною 15 мкм.

Морфологічне дослідження було направлено на вивчення загальної морфології та особливостей стану клітинно-тканинних структур на зрізах тканин, забарвлених гематоксиліном і еозином, а також пікрофуксином за методом ван Гізон для виявлення колагенових волокон, які поряд з еластичними входять до складу позаклітинного матриксу та превалюють за вмістом, за загально прийнятими методиками. Для забезпечення кількісного аналізу отриманих результатів були проведені морфометричні дослідження ширини охрястя в дослідній та контрольній групах після забарвлення гематоксиліном та еозином.

Перегляд та аналіз препаратів проводили з використанням дослідницького сте-

реомікроскопа високого класу «Olympus» SZX16, системного мікроскопа «Olympus» BX-53 з комп'ютерною приставкою. Фотографування препаратів забезпечувалось з використанням цифрової фотокамери-детектора Olympus «DP 72» та Olympus «DP 21» при збільшеннях x100 та x200.

### **Результати досліджень та їх обговорення**

При вивченні забарвлених гематоксиліном і еозином препаратів дослідної групи через 1міс після операції із введенням суспензії МСК в зоні дефекту виявлялося розширення зони охрястя з хондробластами в стані поділу, наявністю та збільшенням активованих ендотеліоцитів з підвищеною базофілією, розростання пухкої сполучної тканини з переважанням фіброblastів, волокнистих елементів та судинних утворень (рис. 1).

Слід сказати, що в окремих ділянках в зоні дефекту іноді виявлялися ознаки розрідження та явища просвітління структур пухкої сполучної тканини, що може бути зумовлено проявом набрякових процесів та нерівномірним заповненням дефекту суспензією введених МСК.

При вивченні препаратів, забарвлених за методом ван Гізона, також відзначалось нерівномірний розподіл колагенових волокон в новоутвореній рубцевій тканині, хоча їх кількість, судячи з виявлення яскравого червоного забарвлення, була значною (рис. 2).

Виявлені результати активного хондрогенезу, ангиогенезу та фібротизації свідчать про виражену активацію регенеративних процесів в зоні дефекту, що може бути віднесено на рахунок стимулюючого впливу імплантації МСК та характерної стимуляції наявних в камбіальному шарі охрястя еластичного вушного хряща ембріональних клітин-попередників хондроцитів [16, 17].

При дослідженні препаратів контрольної групи через 1міс після операції в хрящовій тканині в зоні дефекту виділялося охрястя, в якому виявлялися окремі клітини в стадії поділу, зони лізису, спостерігалось просвітління матриксу та відсутність хондроцитів в прилеглих ділянках, що свідчить про розвиток деструктивних процесів в ре-

зультаті запалення у відповідь на пошкодження (рис. 3). Крім цього, виявлялось розростання тканин з переважанням фіброblastів, клітинних та волокнистих елементів пухкої сполучної тканини, що заповнювала дефект хряща, а також активації ендотеліальних клітин та розростання судин, що свідчить про помірний розвиток процесів загоєння з утворенням рубця (рис. 3).

Вивчення препаратів, забарвлених за методом ван Гізона, показало, що в зоні дефекту також спостерігається наявність пухкої сполучної тканини, явища деструкції та лізису крайової зони хряща та виявляється помірний вміст колагенових волокон біля хрящової пластинки, що додатково свідчить про розвиток поряд з деструктивно-дістрофічними змінами типових процесів загоєння в прилеглих до хряща ділянках, хоча зі зниженням їх інтенсивності (рис. 4).

Отримані результати даних морфологічних досліджень препаратів контрольної групи через 1міс після операції свідчать про активацію хондроцитів охрястя з деяким його потовщенням, наявністю незначної кількості клітин в стані поділу, появою ознак фіброзу та пухкої сполучної тканини (при забарвленні гематоксилін-еозином), проявом помірної активності хондроцитів та фіброblastів зі зниженою активністю колагеногенезу на відмію від дослідної групи, про що свідчить виявлення в зоні охрястя та прилеглих сполучнотканинних структурах помірного червоного забарвлення при забарвленні за методом ван Гізона.

Вивчення морфологічних препаратів через 2міс після введення МСК як в дослідній, так і в контрольній групах свідчить про збереження характеру раніше виявлених змін, що відповідають подальшому розвитку процесів хондрогенезу та фібротизації при загоєнні дефекту хряща та утворенням сполучнотканинного рубця.

Через 3міс після імплантації МСК в зоні дефекту розширення охрястя з наявністю клітин в стані поділу, судинами з базофільними ендотеліоцитами та зріла сполучна тканина без повного відновлення характерної структури хряща, а також з численними фіброblastами і колагеновими волокнами, що відображає їх активний стан репаративних процесів (рис. 5).

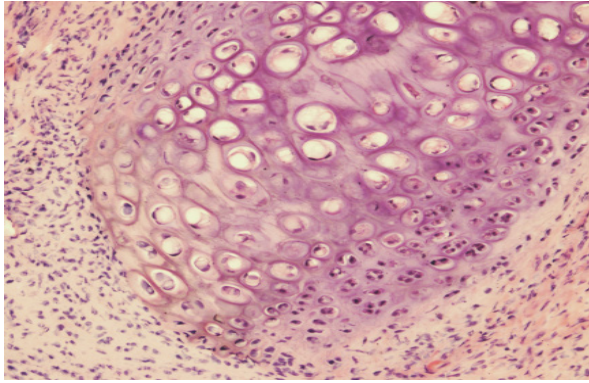


Рис. 1. Розширення зони охрястя з хондробластами в стані поділу і наявності активованих ендотеліоцитів, розростання пухкої сполучної тканини, переважанням фіброblastів, волокнистих елементів та судинних утворень в зоні дефекту. Препарат дослідної групи через 1 міс після введення МСК. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Об. 20, ок. 10.

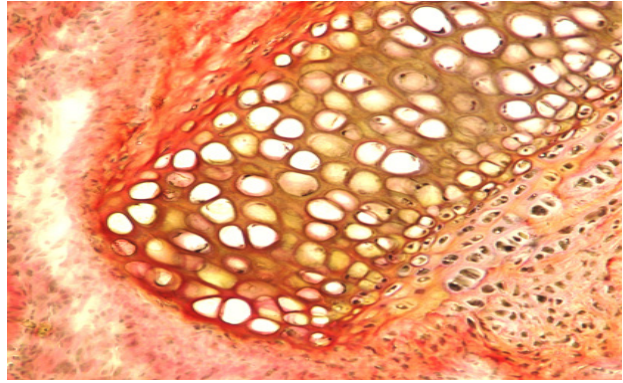


Рис. 2. Виявлення значної кількості колагенових волокон та їх нерівномірний розподіл в новоствореній сполучній тканині в зоні дефекту. Препарат дослідної групи через 1 міс. після введення МСК. Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гізона. Об. 20, ок. 10.

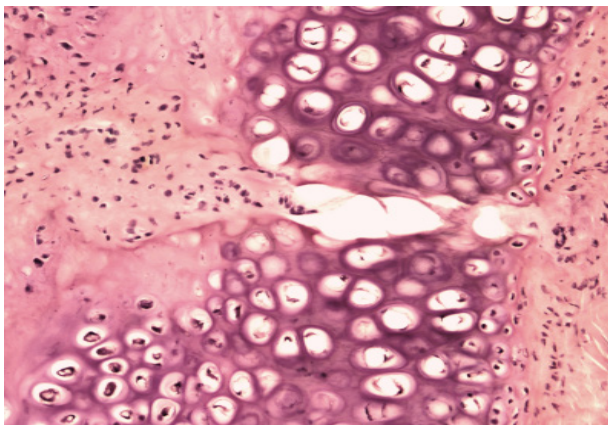


Рис. 3. Охрястя в зоні дефекту з окремими острівцями клітин в стадії поділу, просвітління матриксу та відсутність хондроцитів в прилеглих ділянках, помірного розростання тканин з наявністю клітинних та волокнистих елементів пухкої сполучної тканини, що заповнюють дефект хряща, а також активація ендотеліальних клітин та розростання судин. Препарат хряща зовнішнього вуха кролів контрольної групи через 1 міс. після операції. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Мікрофото. Об. 20, ок. 10.

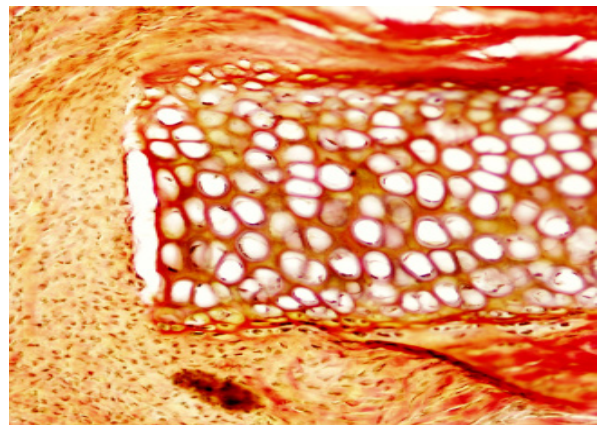


Рис. 4. В ділянках охрястя та прилеглої сполучної тканини зони дефекту виявляється помірна кількість зафарбованих в яскраво червоний колір колагенових волокон. Препарат хряща зовнішнього вуха кролів контрольної групи через 1 міс. після операції. Забарвлення пікрофуксином за методом ван Гізона. Мікрофото. Об. 20, ок. 10.

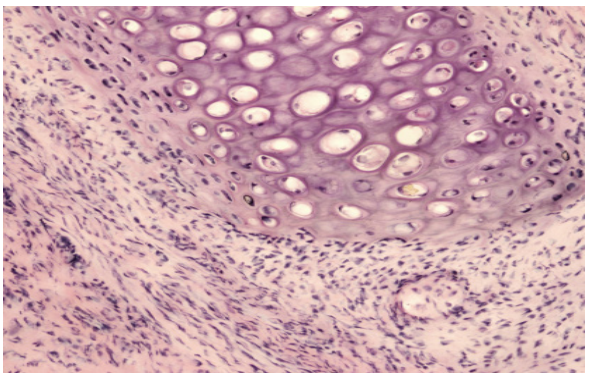


Рис. 5. Розширення охрястя з наявністю клітин в стані поділу та судинами з базофільними ендотеліоцитами та зріла сполучна тканина з численними фіброblastами та колагеновими волокнами в зоні дефекту. Препарат хряща зовнішнього вуха кроля дослідної групи через 3 міс. після введення МСК. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Мікрофото. Об. 20, ок. 10.

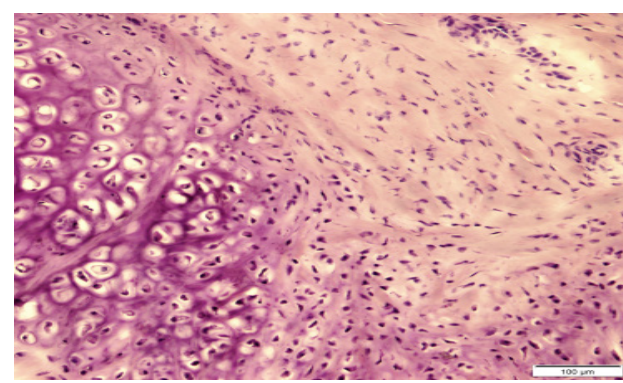


Рис. 6. Розростання хондроцитів з підвищеною їх кількістю в лакунах поєднується з розростанням рубцевої сполучної тканини в зоні дефекту. Препарат хряща зовнішнього вуха кроля дослідної групи через 3 міс. після введення МСК. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Об. 20, ок. 10.



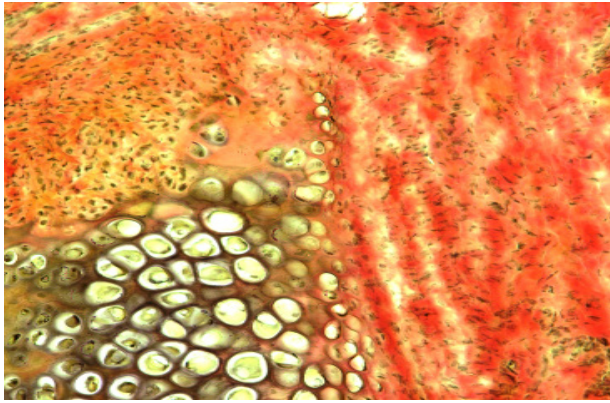


Рис. 7. Значні маси колагену в зоні дефекту. Препарат хряща зовнішнього вуха кроля дослідної групи через 3 міс. після введення МСК. Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гісона. Об. 20, ок. 10.

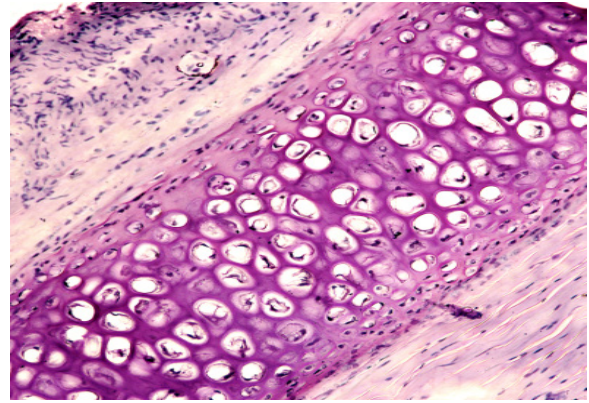


Рис. 8. Зменшення зони хондрогенезу та розширення зони розвитку сполучнотканинної тканини, в якій все ще зберігається наявність значної кількості новостворених судин. Препарат хряща зовнішнього вуха кроля контрольної групи через 3 міс. після операції. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Мікрофото. Об. 20, ок. 10.

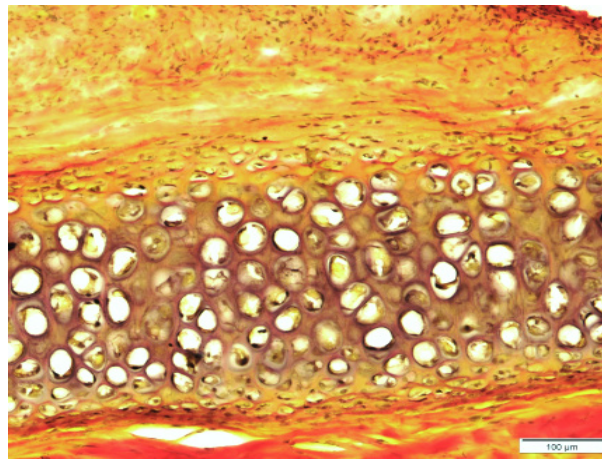


Рис. 9. Помірна кількість забарвлених в яскраво червоний колір колагенових волокон в ділянках охрястя та прилеглої сполучної тканини. Препарат хряща зовнішнього вуха кроля контрольної групи через 3 міс. після операції. Забарвлення пікрофуксином за методом Ван Гісон. Мікрофото. Об. 20, ок. 10.

В цей же час привертають увагу ознаки активного стану розширеного охрястя з наявністю клітин в стані поділу, наявність великої кількості хрящових клітин у лакунах у вигляді ізогенних груп розміщених в тісному контакті з тісно прилягаючими численними фібробластами, волокнами та судинами з базофільними ендотеліоцитами (рис. 6).

Важливо відмітити, що виявлена морфологічна характеристика хрящів в зоні дефекту у даної групи тварин свідчить про активацію хондрогенезу та фібрилогенезу після введення МСК, хоча і при відсутності повного відновлення структури хрящової тканини [4, 5, 9, 11, 12]. Слід також підкреслити, що виявлення значної кількості ізогенних груп хондроцитів особливо характерно для активного росту молодих і спеціалізованих хрящових клітин [15-17]. Крім того, подібне поєднання ізогенних груп хондроцитів з ознаками фібротизації з високим вмістом фібробластів та колагену свідчить про розвиток своєрідної фіброзно-хондродної тканини, що характеризується підвищеною міцністю та може виконувати підтримуючу функцію при загоєнні дефектів хряща.

На препаратах, забарвлених пікрофуксином, в даній групі в зоні дефекту виявляються значні маси колагену, що відповідає активному розвитку зрілої сполучної тканини (рис. 7).

На препаратах, забарвлених пікрофуксином, в даній групі в зоні дефекту виявляються значні маси колагену, що відповідає активному розвитку зрілої сполучної тканини (рис. 7).

Через 3 міс. після операції на препаратах хряща тварин контрольної групи після забарвлення гематоксиліном та еозином відмічається значно нижчий рівень загоєння дефекту, зменшення ширини зони хондрогенезу в охрясті та розширення зони розвитку сполучнотканинного рубця, в якій все ще зберігається наявність значної кількості новостворених судин, що свідчить про зниження темпів дозрівання рубця при значно нижчому рівні вмісту колагену після фарбування пікрофуксином (рис. 8, 9).

Проведені морфометричні дослідження ширини зони активованого охрястя в зоні дефекту для отримання кількісних даних та порівняння результатів дослідної та контрольної груп представлені в табл.

Приведені дані таблиці свідчать про більш виражену активацію зони охрястя в прилеглих до дефекту ділянках на препаратах хрящової тканини зовнішнього вуха кролів дослідної групи, при цьому різниця складає 20,8 % через 1 міс. після операції та 14,2 % – через 3 міс.

Морфометричні дослідження ширини зони активації охрястя

Термін спостереження	Групи	Ширина зони хондрогенезу, мкм	Різниця, %
1 міс.	контроль	57,4±10	20,8
	дослід	72,5±3,6	
3 міс.	контроль	73,3±4,4	14,2
	дослід	85,5±11	

### **Висновки**

Аналізуючи отримані результати виконаних морфологічних досліджень в цілому можна зробити висновок, що введення суспензії алогенних МСК в експерименті в дефект хряща зовнішнього вуха кролів викликає загоєння з активацією попередньо існуючих ембріональних хондробластів охрястя, появою клітин в стані поділу в прилеглий до дефекту зоні, активацією ангиогенезу, збільшенням кількості колагенових волокон, хоча і з нерівномірним їх розподілом, та сприяє фібротизації з переважанням пухкої сполучної тканини через 1 міс. після операції. Через 3 міс. спостерігається більш виражена активація хондрогенезу з розростанням хондроцитів в лакунах, появою ізогенних груп клітин в лакунах, що поєднується з підвищенням вмістом фібробластів та колагенових волокон, розростанням щільної рубцевої сполучної тканини при відсутності повного відновлення характерної хрящової структури. В той же час в контрольній групі в процесі загоєння

дефекту через 1 міс. після операції поряд з виявленням зменшеної зони активації хондроцитів охрястя та колагенових волокон спостерігаються деструктивно-дистрофічні зміни як хондроцитів, так і позаклітинного хрящового матриксу та розвиток фібробластичної реакції, що через 3 міс. поєднується з помірним рівнем колагенових волокон, появою сполучної тканини зі значною кількістю судин як свідченням не закінченого рубцювання.

Дані морфометрії кількісно підтверджують більш виражену активацію хондрогенезу в зоні охрястя в прилеглих до дефекту ділянках в умовах введення МСК в порівнянні з контролем, при цьому різниця складає 20,8 % через 1 міс. та 14,2 % – через 3 міс. після операції.

Результати проведеного дослідження свідчать про перспективність використання МСК для активації репаративних процесів в зоні дефекту хрящової тканини на прикладі зовнішнього вуха кролів.

## Література

1. Sivayoham E, Saunders R, Derby B, Woolford T. Current concepts and advances in the application of tissue engineering in otorhinolaryngology and head and neck surgery. *J Laryngol Otol.* 2013;127(2): 114-20. doi: 10.1017/S0 022215112002642.
2. Chaikovskiy YuB, Gerashchenko SB, Deltsova EI. [Problems and prospects for the use of cartilage stem cells]. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2019;29(4):303-16. <https://doi.org/10.15407/cryo29.04.303>. [Article in Russian].
3. Takebe T, Kobayashi S, Kan H, Suzuki H, Yabuki Y, Mizuno M, et al. Human elastic cartilage engineering from cartilage progenitor cells using rotating wall vessel bioreactor. *Transplant Proc.* 2012;44(4):1158-61. doi: 10.1016/j. transproceed.2012.03.038.
4. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplant.* 2016;25(5):829-48. doi: 10.3727/096368915X689622.
5. Rohban R, Pieber TR. Mesenchymal stem and progenitor cells in regeneration: tissue specificity and regenerative potential. *Stem Cells Int.* 2017; 2017:5173732. doi: 10.1155/2017/ 5173732.
6. Chen PM, Yen ML, Liu KJ, Sytwu H-K, Yen B-L. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 2011;18(1):49. doi: 10.1186/1423-0127-18-49.
7. Liu S, Liu F, Zhou Y, Jin B, Sun Q, Guo S. Immunosuppressive Property of MSCs Mediated by Cell Surface Receptors. *Front Immunol.* 2020;11:1076. doi:10.3389/fimmu.2020.01076.
8. Hu C, Li L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med.* 2018;22(3):1428-42. doi: 10.1111/jcmm.13492.
9. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song G. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells.* 2019;8(8):784. doi: 10.3390/cells8080784.
10. Chang SC, Tobias G, Roy AK, Vacanti CA, Bonassar LJ. Tissue engineering of autologous cartilage for craniofacial reconstruction by injection molding. *Plast Reconstr Surg.* 2003;112(3):793-9; discussion 800-1. doi: 10.1097/ 01.PRS.0000069711.31021.94.
11. Kaboodkhani R, Mehrabani D, Karimi-Busheri F. Achievements and Challenges in Transplantation of Mesenchymal Stem Cells in Otorhinolaryngology. *J Clin Med.* 2021;10(13):2940. doi: 10.3390/jcm10132940.
12. Merimi M, El-Majzoub R, Lagneaux L, Moussa Agha D, Bouhtit F, Meuleman N, et al. The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine: Current Knowledge and Future Understandings. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9:661532. doi: 10.3389/fcell.2021.661532.
13. Bly RA, Bhrany AD, Murakami CS, Sie KC. Microtia Reconstruction. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2016;24(4):577-591. doi: 10.1016/j.fsc.2016. 06.011.
14. ULAM Rabbit Anesthesia and Analgesia Guidelines. Available at: <https://az.research.umich.edu/animalcare/guidelines/guidelines-anesthesia-and-analgesia-rabbits>.
15. Histology.mp3. Skeletal tissues (part 2). [http://www.morphology.dp.ua/\\_mp3/skeletal2.php](http://www.morphology.dp.ua/_mp3/skeletal2.php) [In Ukrainian].
16. Togo T, Utani A, Naitoh M, Ohta M, Tsuji Y, Morikawa N, Nakamura M, Suzuki S. Identification of cartilage progenitor cells in the adult ear perichondrium: utilization for cartilage reconstruction. *Lab Invest.* 2006;86(5):445-57. doi: 10.1038/labinvest.3700409.
17. Gu J, Wang B, Wang T, Zhang N, Gui J, Lu Y. Effects of Cartilage Progenitor Cells, Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Chondrocytes on Cartilage Repair as Seed Cells: An in vitro Study. *Drug Des Devel Ther.* 2022;16:1217-1230. doi: 10.2147/DDDT.S356936.

Надійшла до редакції 02.05.2022

© Ю.В. Мінін, А.Ф. Карась, Г.А. Карась, С.П. Чайка, П.А. Вірич, Т.І. Кучеренко, Н.С. Шувалова, Т.Я. Раскалей, 2022

**МОРФОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ РЕПАРАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ В ЗОНІ ДЕФЕКТУ ХРЯЦОВОЇ ТКАНИНИ ЗОВНІШНЬОГО ВУХА КРОЛІВ ПІСЛЯ МІСЦЕВОГО ЗАСТОСУВАННЯ АЛОГЕННИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН**

<sup>1</sup>Мінін ЮВ, <sup>1</sup>Карась АФ, <sup>1</sup>Карась ГА, <sup>1</sup>Кучеренко ТІ, <sup>1</sup>Чайка СП,  
<sup>1</sup>Вірич ПА, <sup>1</sup>Шувалова НС, <sup>2</sup>Раскалей ТЯ

<sup>1</sup>Державна установа “Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка  
Національної академії медичних наук України”;

<sup>2</sup>Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

Email: gkaras@ukr.net

*А н о т а ц і я*

**Мета:** вивчення особливостей відновлення еластичної хрящової тканини зовнішнього вуха кролів в зоні дефекту після його заповнення алогенними мезенхімальними стволовими клітинами (МСК).

**Матеріали і методи:** Дослідження були проведені на 24 статевозрілих кролях. Всім тваринам під загальною анестезією проводили операцію по створенню стандартизованого лінійного дефекту та розподіляли на контрольну (9 тварин) та дослідну (15 кролів) групи. В дослідній групі дефект заповнювали суспензією МСК в кількості 5 млн клітин, а в контрольній дефект зашивали без введення клітин. МСК отримували з пупкового канатика кролів ферментативним методом. Після першого пасажу культури МСК проводили вивчення їх стовбурового потенціалу та перевіряли на здатність до диференціації. Матеріал для морфологічних досліджень забирали через 1; 2 та 3 місяці, готували криостатні зрізи, проводили забарвлення гематоксиліном та еозином, а також пікрофуксином за ван Гізона, а також морфометрію.

**Результати:** Проведені морфологічні дослідження репаративних процесів в зоні дефекту хрящової тканини зовнішнього вуха кролів свідчать про те, що введення мікрочас алогенних МСК в експерименті викликає загоєння з активацією попередньо існуючих ембріональних хондробластів охрястя, появою клітин в стані поділу в обмеженій прилеглий зоні та сприяє фібротизації з переважанням пухкої сполучної тканини через 1 міс після операції. Через 3 місяці спостерігається більш виражена активація хондрогенезу з розростанням хондроцитів та підвищеною їх кількістю в лакунах, що поєднується з розростанням щільної рубцевої сполучної тканини при відсутності повного відновлення характерної хрящової структури. В той час в контрольній групі в процесі загоєння дефекту через 1 міс після операції поряд з виявленням зменшеної зони активації хондроцитів охрястя спостерігається розвиток деструктивно-дистрофічних процесів як хондроцитів так і позаклітинного хрящового матриксу та підвищеної фібробластичної реакції, що через 3 місяці поєднується з розвитком рубцевої сполучної тканини з наявністю значної кількості судин як свідчення не закінченого рубцювання. Дані морфометрії кількісно підтверджують більш виражену активацію хондрогенезу в зоні охрястя в прилеглих до дефекту ділянках в умовах введення МСК в порівнянні з контролем, при цьому різниця складає 20.8 % через 1міс після операції та 14,2 % через 3 міс.

**Висновки:** Отримані результати свідчать про перспективність використання МСК для активації репаративних процесів в зоні дефекту хряща зовнішнього вуха.

**Ключові слова:** репаративна медицина, хрящ, мезенхімальні стволові клітини (МСК), експериментальні дослідження.

**MORPHOLOGICAL INVESTIGATION OF REPARATIVE PROCESSES IN THE AREA OF THE DEFECT OF CARTILAGE TISSUE OF THE EXTERNAL EAR OF THE RABBIT AFTER THE LOCAL APPLICATION OF ALLOGENIC MESENCHYMAL STEM CELLS**

<sup>1</sup>Minin YuV, <sup>1</sup>Karas AF, <sup>1</sup>Karas GA, <sup>1</sup>Kucherenko TI, <sup>1</sup>Chaika SP,  
<sup>1</sup>Virych PA, <sup>1</sup>Shuvalova NS, <sup>2</sup>Raskaliev TY

<sup>1</sup>State Institution «O. S. Kolomiychenko Institute of otolaryngology  
of National academy of medical sciences of Ukraine»;

<sup>2</sup>Bogomolets National Medical University

Email: gkaras@ukr.net

*Annotation*

**Purpose:** to study the features of the restoration of rabbits outer ear elastic cartilage tissue in the area of the defect after its filling with allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs).

**Materials and methods:** Studies were performed on 24 sexually mature rabbits. All animals under general anaesthesia underwent surgery to create a standardized linear defect and were divided into experimental (15 rab-



bits) and control (9rabbits) groups. In the experimental group, the defect was filled with suspensions of MSCs in the amount of 5 million cells, and in the control group of cells was not introduced. MSCs were obtained from the umbilical cord of rabbits by the enzymatic method. After the first passage of the MSCs culture, was studied MSCs stem potential and tested ability to differentiating. Material for morphological studies was taken after 1, 2 and 3 months, cryostat sections were prepared hematoxylin-eosin and picrofuxin staining were performed according to van Gizon, as well as morphometry.

**Results:** The introduction of suspensions of allogeneic MSCs in the experiment in the cartilage defect of the outer ear of rabbits causes healing with the activation of pre-existing embryonic cartilage cells, the appearance of cells in a state of division in the adjacent zone, activation of angiogenesis and promotes fibrotization with a predominance of loose connective tissue 1 month after surgery. After 3 months, a more pronounced activation of chondrogenesis is observed with the growth of chondrocytes and their increased number in lacunae, the appearance of isogenic groups of cells, which is combined with vascular activation and the growth of dense scar connective tissue, increased fibroblasts and the number of collagen fibers in the defect area, as well as in the absence of a complete restoration of the characteristic cartilage structure. At that time, in the control group, in the process of defect healing 1 month after the operation, along with the detection of a reduced zone of activation of cartilage chondrocytes and collagen fibers, the development of destructive-dystrophic processes of chondrocytes and the extracellular cartilage matrix was observed. The morphometry data quantitatively confirm a more pronounced activation of chondrogenesis in the areas adjacent to the cartilage defect under the conditions of MSC injection compared to the control. The difference is 20.8% 1 month after the operation and 14.2% 3 months later. The results obtained indicate the promise of using MSCs to activate reparative processes in the area of rabbits outer ear cartilage tissue defect.

**Key words:** reparative medicine, cartilage, mesenchymal stem cells, experimental studies.