

EVALUATION OF THE RADIOGRAPHIC PICTURE IN THE AREA OF A BONE DEFECT FILLED WITH OSTEOPLASTIC MATERIAL BASED ON HYDROXYAPATITE

Svetlana Vl. Chernigova, Dr.Habil. of Veterinary Sciences
Valeria Olegovna Savidi

Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Russia

Reparative regeneration of bone tissue occurs by activating complex biological processes. In some cases, there is a need to stimulate these processes using biomaterials. One of the suitable biomaterials that has a stimulating effect on osteogenesis is hydroxyapatite doped with silicate ions (silicate-substituted hydroxyapatite). Analogues of this biomaterial are used to replace bone tissue in clinical practice and show relatively high efficiency of use, which makes it possible to improve the structure by introducing various components into it. Thus, the osteoplastic material we proposed is being studied for the efficiency of use and evaluation of stimulation of reparative regeneration. Preclinical study was conducted on the basis of the Institute of Biomedical and Biological Sciences of the Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin. In vivo studies were conducted using granules of silicate-substituted hydroxyapatite in a ratio of 50/50 to wollastonite with a diameter of 0.5 mm. The objects of the study were laboratory rabbits with models of bone defects performed in the form of an induced fracture of the proximal third of the tibia diaphysis with subsequent fixation by transosseous introduction of pins. Groups of animals were formed: experimental with the introduction of silicate-substituted hydroxyapatite granules into the defect cavity and control without defect replenishment. To assess the course of reparative regeneration and osteogenesis, an X-ray examination was performed on the 7th and 21st days, and an assessment of the clinical condition of the animals was carried out for 30 days. According to the X-ray images obtained on the 7th day, the following changes were revealed: the experimental group of animals showed signs of new bone tissue formation, as well as full contact of the defect cavity with the studied osteoplastic material, while in animals from the control group, clearly defined edges of the defect zone are visualized without signs of bone regenerate formation. Repeated X-ray examination on the 21st day showed pronounced signs of bone callus formation in the experimental group, while in the control group the regeneration process was slower, the formation of bone regenerate was less pronounced, and initial signs of fibrocartilaginous bone callus formation were noted. The data obtained during the study suggest that silicate-substituted hydroxyapatite has a stimulating effect on reparative regeneration and requires further study.

Key words: silicate-substituted hydroxyapatite, bone defect, osteoplastic material, reparative regeneration, veterinary traumatology.

REFERENCES

1. Mukhametov U.F., Lyulin S.V., Borzunov D.Yu. Potential for using hydroxyapatite-based bone substitute materials in spinal surgery. *Creative surgery and oncology*. 2022. 12(4). P. 337–344.
2. Kononovich N.A. et al. Features of osteogenesis in replacing a circular defect in the diaphysis of the lower leg bones using the collagen-apatite composite "litar" (experimental study) // *Transbaikal Medical Bulletin*. 2019. No. 4. P. 69-77.
3. Zyulkina L.A. et al. Features of reparative osteogenesis using various compositions of osteoplastic material // *Original research*. 2021. No. 12. P. 289-292.
4. Pichugin Yu.V., Ermolaev V.A., Maryin E.M. Experience in treating tubular bone fractures in dogs using a

- biocomposite and a lightweight design of the external fixation apparatus // *Bulletin of the Ulyanovsk State Agricultural Academy*. 2019. No. 3 (47) P. 131–136.
5. Rozhdestvensky A.A. et al. First results of the experimental use of a synthetic material based on a mixture of calcium phosphate and silicate to replace bone defects // *Modern problems of science and education*. 2022. No. 3. P. 137–148.
6. Ge R. et al. In vivo therapeutic effect of wollastonite and hydroxyapatite on bone defect // *Biomed Mater*. 2019. No. 14 (6). P. 1–13.
7. Jeong. et al. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res*. 2019. No. 23. P. 1–11.

УДК 619:617.3: 616-08-039.73

DOI: 10.52419/issn2782-6252.2024.3.88

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК У ЛОШАДЕЙ ПРИ ОРТОПЕДИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Чернигова С.В.¹, Сучков М. В., Захарова А. В., Плющий И. В., Зубкова Н.В.¹

¹Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия

РЕФЕРАТ

Разработка способа лечения ортопедических заболеваний лошадей с использованием стволовых клеток, в частности аллогенных мезенхимальных стромальных клеток, является актуальной научно-прикладной задачей ветеринарной медицины. Широкое применение тканеинженерных технологий ограничено отсутствием обширных клинических исследований, которые подтверждали бы эффективность и безопасность данной терапии. Цель исследования – определение терапевтической эффективности парентерального введения аллогенных мезенхимальных стромальных клеток лошадям при ортопедических заболеваниях. В исследовании приняли участие 4 лошади с десмитом подвешивающей связки (межкостной третьей мышцы). Мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из жировой ткани донора, вводили в зону повреждения подвешивающей связки двукратно с интервалом 14 суток в дозе 2×10^6 клеток, суспендированных в 2-15 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Инъекции не вызвали развитие воспалительных реакций. Согласно результатам исследования все лошади вернулись к полноценной тренировке в среднем через $3,2 \pm 0,01$ месяцев после начала терапии.

Ключевые слова: лошадь, мезенхимальные стромальные клетки, сухожилие, регенерация, ортопедия, стволовые клетки, десмит.

ВВЕДЕНИЕ

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) — это мультипотентные прогениторные клетки, которые выделяются из различных тканей взрослого организма. МСК получают из различных тканей: костный мозг [6], жировая ткань [3], ткань пуповины [7], пуповинная кровь [4]. Костный мозг содержит умеренное количество МСК и их количество снижается у пожилых животных. Жировая ткань содержит высокую концентрацию МСК, так в 200–500 раз больше, чем в аспирате костного мозга. МСК, полученные из тканей пуповины и пуповинной крови, обладают высоким потенциалом пролиферации [5]. Зрелые МСК нашли различные области терапевтического применения, включая регенерацию тканей, ангиогенез и иммуномодуляцию. В конной медицине МСК широко используются для лечения ортопедических травм сухожилий, связок, хрящей и костей [1,2].

МСК могут быть получены из культуры собственных тканей пациента, однако использование аутологичных клеток для лечения пациентов имеет свои ограничения. Так, лечение острых поражений не представляется возможным, поскольку выращивание МСК занимает в среднем от 12 до 21 суток. Альтернативным вариантом служит использование аллогенных МСК, взятых от донора. Однако эффективность аллогенных клеток при их введении лошадям пока не до конца изучена и является преимущественным направлением.

Целью данного исследования являлось определение терапевтической эффективности парентерального введения аллогенных МСК лошадям при ортопедических заболеваниях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Забор жировой ткани проводили в области основания хвоста. Лошадям ($n=7$) внутривенно седатировали ксилазином 10% (0,5 мг/кг) с последующим введением инвертированного L-блока местного анестетика с использованием 2%-го лидокаина гидрохлорида. Примерно 2-5 г жировой ткани была помещена в стерильную коническую пробирку объемом 50 мл, содержащей стерильный раствор с антибиотиками. Образец жировой ткани трижды промывали раствором, содержащим антибиотики, и далее подвергали механическому разделению с помощью скальпеля и анатомических щипцов, затем помещали в раствор 0,05% коллагеназы 1 типа при 37°C на 30 минут. По истечении этого времени раствор фильтровали и добавляли DMEM, центрифугировали раствор. Клетки культивировали при плотности примерно $7-10 \times 10^3$ клеток/см² в культуральных флаконах площадью 25 см² с культуральной средой при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂. Культурную среду меняли каждые два-три дня до достижения конfluence клеток $\geq 80\%$ (рис. 1).

Имплантация проводилась под седацией и/или местной анестезией. Введение аллогенных МСК проводили в зону поражения двукратно с интервалом 14 суток в дозе 20×10^6 клеток, суспен-

дированных в 2-15 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Все лошади ежедневно осматривались врачом на предмет клинических признаков воспаления (отек, боль при надавливании, местная температура), включая потенциальное возникновение любого явного аномального образования ткани. Ультразвуковое исследование проводилось с использованием линейного датчика Mindray DP-50 VET до и после проведенной терапии. Оценивали характер выравнивания волокон, эхогенность, размер поражения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемую группу составили 4 лошади в возрасте 5-10 лет. В 100% случаев воспаление межкостного третьего мускула было обусловлено травмой во время тренировок (табл. 1).

При проведении биопсии жировой ткани, ни введение МСК не сопровождалось развитием побочных реакций, а также не было отмечено аномального образования тканей в подвешивающей связки после инъекции у любой из лошадей. Клиническое наблюдение показало, что припухлость в области инъекции наблюдалась на следующий день после первичного введения МСК. Признаки воспаления у лошадей значительно уменьшились через $7 \pm 0,1$ суток, а хромота при движении шагом и рысью отсутствовала через $38 \pm 0,2$ суток после инъекции МСК.

Результаты визуализации через 3 месяца после повторного введения МСК показали схожие тенденции со значительным улучшением показателя ультрасонографии: отсутствие отека, дефект заполнен тканью, волокна параллельны, плотность удовлетворительная (рис. 2).

После двух дней полного покоя в деннике от момента повторного введения МСК лошади приступали к программе реабилитации, которая включала в себя шаговые проводки «в руках» с постепенным наращиванием времени нагрузки и в течение месяца полное введение в полноценную работу. Так, лошади вернулись к тренировкам, включая галоп, в среднем через $3,2 \pm 0,01$ месяцев наблюдения, не получив повторной травмы до конца наблюдения в 12 месяцев.

Принимая во внимание текущие результаты лечения раннего течения воспаления подвешивающей связки, которые включают снижение клинических признаков воспаления, можно интерпретировать как признаки эффективного иммуномодулирующего действия. Было показано, что в тканях этот эффект опосредован макрофагами и также связан с временным увеличением васкуляризации и перфузии [5]. Раннее временное увеличение перфузии крови и долгосрочное снижение воспаления служат основой для улучшенной регенерации тканей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное клиническое исследование предоставляет уникальную возможность модернизации и масштабирования в конной медицине способа лечения лошадей с ортопедическими заболеваниями с использованием аллогенных МСК.

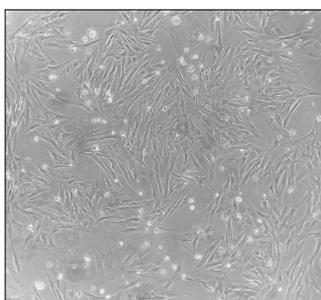


Рисунок 1. МСК, полученные из жировой ткани (конфлюэнтность $\geq 80\%$)

Таблица 1.

Список лошадей, отобранных для клинических исследований

| Кличка | Честер | Капитал | Квайт | Лерой |
|-----------------------------------|--|--|---|--|
| Возраст, лет | 7 | 5 | 10 | 9 |
| Порода | помесь верховой и траккененской | голштинская | вестфальская | голштинская |
| Диагноз | десмит с надрывом проксимального отдела подвешивающей связки | десмит с надрывом около 15% волокон латеральной ножки подвешивающей связки | десмит с надрывом медиальной ножки подвешивающей связки | десмит с надрывом проксимального отдела подвешивающей связки |
| Локализация (конечность) | правая грудная | правая грудная | правая грудная | правая тазовая |
| Оценка хромоты, балл (шкала ААЕР) | 2 | 3 | 3 | 2 |

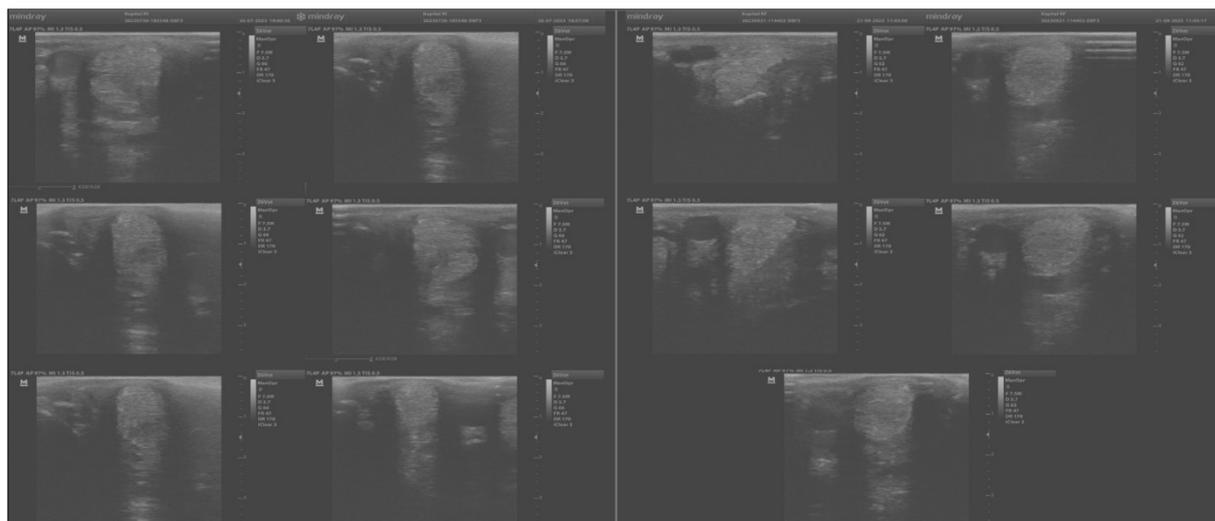


Рисунок 2. Ультрасонографические снимки места повреждения лошади по кличке Капитал до (А) и после (Б) инъекций МСК через 2,5 месяца.

ЛИТЕРАТУРА

- Чернигова, С. В. Применение стволовых клеток в лечении животных с различными видами ран (обзор литературы) / С. В. Чернигова, К. Ф. Якубаева, Н. В. Зубкова // Современные тенденции развития ветеринарной науки и практики : Сборник материалов Всероссийской (национальной) научно-практической конференции, Омск, 25–29 апреля 2022 года. – Омск: Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, 2022. – С. 464–469. – EDN DGQAEM.
- Опыт лечения лошадей с короткими неполными сагиттальными переломами проксимальной фаланги / С. В. Чернигова, М. В. Сучков, Н. В.

- Зубкова, А. И. Карклин // Международный вестник ветеринарии. – 2022. – № 4. – С. 421–426. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2022.4.421. – EDN QVOYIJ.
- Alipour F, Parham A, Kazemi Mehrjerdi H, Dehghani H. Equine adipose-derived mesenchymal stem cells: phenotype and growth characteristics, gene expression profile and differentiation potentials. // Cell J., 2015. - №16(4). – P. 456–65. doi: 10.22074/cellj.2015.491. Epub 2015 Jan 13. PMID: 25685736; PMCID: PMC4297484.
- Characterization and clinical application of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood / Jun-Gu Kang, Sang-Bum Park, Min-Soo Seo, Hyung-Sik Kim, Joon-Seok Chae, Kyung-Sun

Kang // Journal of Veterinary Science, 2013. - №14 (3). – P. 367-371. 10.4142/jvs.2013.14.3.367.

5. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential / Barberini, D.J., Freitas, N.P.P., Magnoni, M.S. [et al.] // Stem Cell Res Ther, 2014. - №5. – P. 25. <https://doi.org/10.1186/scrt414>.

6. Isolation of equine bone marrow-derived mesen-

chymal stem cells: a comparison between three protocols / Bourzac C, Smith LC, Vincent P, Beauchamp G, Lavoie JP, Laverty S. // Equine Vet J, 2010. – 42(6). – P. 519-27. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00098.x. PMID: 20716192.

7. Koch TG, Heerkens T, Thomsen PD, Betts DH. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood // BMC Biotechnol, 2007. – №7. – P. 26–35. 7

CLINICAL USE OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN HORSES WITH ORTHOPEDIC DISEASES

S.V. Chernigova¹, M.V. Suchkov, A.V. Zakharova, I.V. Plyushchii, N.V. Zubkova¹
Omsk State Agrarian University, Omsk, Russia

The development of a method for the treatment of orthopedic diseases of horses using stem cells, in particular allogeneic mesenchymal stromal cells, is an urgent scientific and applied task of veterinary medicine. The widespread use of tissue engineering technologies is limited by the lack of extensive clinical studies that would confirm the effectiveness and safety of this therapy. The aim of the study was to determine the therapeutic efficacy of parenteral administration of allogeneic mesenchymal stromal cells to horses in orthopedic diseases. The study involved 4 horses with desmitis of the suspensory ligament (interosseous third muscle). Mesenchymal stromal cells isolated from donor adipose tissue were injected into the area of damage to the suspensory ligament twice with an interval of 14 days at a dose of 2×10^6 cells suspended in 2-15 ml of 0.9% sodium chloride solution. Injections did not cause the development of inflammatory reactions. According to the results of the study, all horses returned to full training on average 3.2 ± 0.01 months after the start of therapy.

Key words: horse, mesenchymal stromal cells, tendon, regeneration, orthopedics, stem cells, desmitis.

REFERENCES

1. Chernihiv, S. V. The use of stem cells in the treatment of animals with various types of wounds (literature review) / S. V. Chernihiv, K. F. Yakubbaeva, N. V. Zubkova // Modern trends in the development of veterinary science and practice : Collection of materials of the All-Russian (national) Scientific and practical Conference, Omsk, April 25-29, 2022. Omsk: Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, 2022. – pp. 464-469. – Edited by DGKAI.

2. The experience of treating horses with short incomplete sagittal fractures of the proximal phalanx / S. V. Chernihiv, M. V. Suchkov, N. V. Zubkova, A. I. Karklin // International Bulletin of Veterinary Medicine. - 2022. – No. 4. – Pp. 421-426. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2022.4.421. – SECOND EDITION.

3. Alipour F., Parham A., Kazemi Mehrjerdi H., Dehghani H. Mesenchymal stem cells derived from equine adipose tissue: phenotype and growth characteristics, gene expression profile and differentiation potential. // Cell J., 2015. - №16(4). – Pp. 456-65. doi: 10.22074/Cell J.2015.491. Epub, January 13, 2015. PMID: 25685736; PMCID:

PMC4297484.

4. Characteristics and clinical application of mesenchymal stem cells from the umbilical cord blood of horses / Jung Gu Kang, Sang Bum Park, Min Soo So, Hyun Sik Kim, Jung Seok Chae, Kyung Song Kang // Journal of Veterinary Sciences, 2013. - №14(3). – Pp. 367-371. 10.4142/sp.2013.14.3.367.

5. Mesenchymal stem cells of horses from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characteristics and differentiation potential / Barberini D.J., Freitas N.P., Magnoni M.S. [et al.] // Stem cell Research, 2014. - No.5. – P. 25. <https://doi.org/10.1186/scrt414>.

6. Isolation of mesenchymal stem cells from equine bone marrow: a comparison of three protocols / Burzak S., Smith L.K., Vincent P., Beauchamp G., Lavoie J.P., Laverty S. // Veterinarian of horses J., 2010. – 42(6). – P. 519-27. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00098.x. PMID: 20716192.

7. Koch T.G., Heerkens T., Thomsen P.D., Betts D.H. Isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood of horses // BMC Biotechnol, 2007. – No.7. – pp. 26-35. 7

По заявкам ветспециалистов, граждан, юридических лиц проводим консультации, семинары по организационно-правовым вопросам, касающихся содержательного и текстуального анализа нормативных правовых актов по ветеринарии, практики их использования в отношении планирования, организации, проведения, ветеринарных мероприятий при заразных и незаразных болезнях животных и птиц.

Консультации и семинары могут быть проведены на базе Санкт-Петербургского университета ветеринарной медицины или с выездом специалистов в любой субъект России.

**Тел/факс (812) 365-69-35, Моб. тел.: 8(911) 913-85-49,
e-mail: 3656935@gmail.com**