

РІВЕНЬ КАЛІЮ В СИРОВАТЦІ КРОВІ КРОЛІВ З ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНИМ УШКОДЖЕННЯМ М'ЯЗІВ ЗА ВПЛИВУ ТРАНСПЛАНТОВАНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

*Н. В. Стадник, аспірантка,
А. Й. Мазуркевич, д-р вет. наук, професор*

Національний університет біоресурсів і природокористування України
вул. Героїв Оборони, 11, м. Київ, 03041, Україна
stadnyk7288@gmail.com

У ветеринарній медицині, серед спортивних та службових тварин, поширені випадки травм м'язів кінцівок, такі як розриви, розтягнення та пошкодження скелетної м'язової тканини. Ці травми є складними проблемами для тварин, оскільки традиційні методи лікування тривалі та не завжди успішні. У тварин скелетні м'язи є пластичними та динамічними тканинами, які можуть пристосовуватися до різних умов, таких як зміна типів волокон, гіпертрофія, та відновлюватися після травм.

Основна мета статті полягає в обговоренні, аналізі та узагальненні результатів досліджень, що націлені на використання аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин – засобів регенеративної терапії – у ветеринарній практиці.

Головним напрямком клітинної терапії є використання аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин (МСК). Ці клітини є недиференційованими та можуть самостійно оновлюватися, що дозволяє їм розвиватися у клітини зі специфічними функціями і стати ефективним лікувальним засобом для відновлення тканин. Зокрема, МСК є перспективними для ветеринарної медицини, оскільки їх легко виділити та культивувати.

У статті розглядається аналіз щодо застосування аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин для відновлення тканин у ветеринарній медицині на експериментальних тваринах з урахуванням наукових досліджень і результатів досліджень авторів статті.

Використання інноваційного та перспективного методу лікування тварин з пошкодженою м'язовою тканиною, що ґрунтується на клітинній регенерації, може значно прискорити видужання тварин після травми і уникнути побічних ефектів, що виникають при традиційних методах лікування.

Ключові слова: КАЛІЙ, АЛОГЕННІ МЕЗЕНХІМАЛЬНІ СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ, КРОЛІ, СКЕЛЕТНІ М'ЯЗИ, РЕГЕНЕРАЦІЯ, КЛІТИННА ІНЖЕНЕРІЯ.

THE LEVEL OF POTASSIUM IN THE BLOOD SERUM OF RABBITS WITH EXPERIMENTAL MUSCLE DAMAGE UNDER THE INFLUENCE OF TRANSPLANTED STEM CELLS

N. V. Stadnyk, A. I. Mazurkevich

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
15, Heroyiv Oborony Str., Kyiv, 03041, Ukraine
stadnyk7288@gmail.com

In veterinary medicine, limb muscle injuries in sports and working animals, such as tears, sprains, and skeletal muscle damage, are common. These injuries pose challenging problems in

animals because traditional treatments are lengthy and not always successful. In animals, skeletal muscles are plastic and dynamic tissues that can adapt to different conditions, such as fiber type changes and hypertrophy, and recover from injuries.

The main purpose of this article is to discuss, analyze and summarize the results of research aimed at the use of allogeneic mesenchymal stem cells, a means of regenerative therapy, in veterinary practice.

The main direction of cell therapy is the use of allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs). These cells are undifferentiated and can renew themselves, which allows them to develop into cells with specific functions and become an effective treatment for tissue repair. In particular, mesenchymal stem cells are promising for veterinary medicine, as they are easy to isolate and cultivate and have no ethical issues regarding their use.

The article discusses the application of the analysis of the use of allogeneic mesenchymal stem cells for tissue repair in veterinary medicine in experimental animals, taking into account scientific research and the results of the authors' research.

The use of an innovative and promising method of treating animals with damaged muscle tissue based on cellular regeneration can significantly accelerate the recovery of animals after injury and avoid the side effects that occur with traditional methods of treatment.

Keywords: POTASSIUM, ALLOGENEOUS MESENCHIMAL STEM CELLS, RABBITS, SKELETAL MUSCLES, REGENERATION, CELL ENGINEERING.

Досліди були проведені у Навчально-науковій лабораторії "Центр клітинних технологій у ветеринарній медицині" факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України (кафедра хірургії та патофізіології імені академіка І.О. Поваженка) відповідно до вимог чинних вітчизняних нормативно-правових документів, Директиви № 2010/63/ЄС "Про захист тварин, що використовуються з науковою метою", Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" (15.12.2009. Відомості ВР, 2010, № 9), "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" інших нормативно-правових документів.

Дозвіл на проведення відповідних експериментів був отриманий від локальної комісії з біоетики НУБіП України, згідно з протоколом № 110/3-пр-2018 від "02" листопада 2018 року, представники якої здійснювали моніторинг умов утримання дослідних тварин та їх використання в експериментах від початку до завершення досліджу.

Матеріали і методи. Для проведення дослідів були використані кролі породи метелик, самці в кількості 105 голів, віком 3 місяці, вагою 2,500–3,000 кг. Всі відібрані тварини мали однакові стандартні умови розведення та утримання, догляду і годівлі. Для дослідження було ретельно відібрано кролів та перевірено їх загальний стан здоров'я (Han et al., 2020; Percie du Sert et al., 2020).

Згідно з методичними рекомендаціями, розробленими співробітниками кафедри хірургії і патофізіології ім. акад. І. О. Поваженка НУБіП України «Отримання фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку кролів із високою проліферативною активністю», проводили культивування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин. З червоного кісткового мозку тварин-донорів отримували МСК. Відбирали його згідно із розробленим способом прижиттєвого отримання червоного кісткового мозку у дрібних тварин, який включає відбір кісткового мозку у ділянці проксимальних та дистальних епіфізів відповідних кісток плечової і стегнової (Freitag et al., 2019).

Лабораторні дослідження проведені в умовах ветеринарній лабораторії «Бальд» та навчально-науково-виробничого клінічного центру «Ветмедсервіс».

Операцію з експериментального ушкодження м'язової тканини проводили під загальним наркозом. Тварину фіксували на операційному столі, звільняли місце оперативного доступу від шерсті шляхом вибривання електричною машинкою та обробляли розчином

Кутасепт Ф. Перед введенням тварини в загальний наркоз внутрішньом'язово вводили антихолінергічний засіб, який блокує переважно периферичні холінореактивні системи, а також атропіну сульфат в дозі 0,05 мг/1 кг маси тіла тварини для запобігання бронхо- і ларингоспазмам, зменшенню секреції залоз, рефлексорних реакцій і побічних ефектів, зумовлених збудженням блукаючого нерва. Згодом вводили внутрішньом'язово препарат «Золетил 100» в дозі 8 мг/1 кг маси тіла тварини. В місці оперативного доступу попередньо проводили інфільтраційну анестезію 0,5 % розчином новокаїну (доза 3 мл/голову) в заплановану частину змодельованого дефекту. Моделювання травми м'язової тканини проводили методом розтинання шкіри та фасції і відсікання в ділянці серединної площини тазової голівки двоголового м'яза стегна, розміром 1,5 x 1,5 см на глибину 1,5 см м'язової тканини (De Lima Santos et al., 2019).

Тварин із експериментальним ушкодженням м'язової тканини розділили на 4 основні групи. Кролям 1-ої групи в місце експериментального дефекту вводили за допомогою інсулінового шприца попередньо заготовлені дози (3 млн/тварину) алогенних мезенхімальних стовбурових клітин, які отримували за методикою, розробленою співробітниками кафедри хірургії і патофізіології імені акад. І. О. Поваженка НУБіП України «Отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку кролів із високою проліферативною активністю». Після цього фасцію та шкіру зашивали синтетичним поліфіламентним розсмоктувальним шовним матеріалом Вікріл (Vicryl, Бельгія). Тваринам 2-ої дослідної групи вводили таку ж кількість алогенних МСК в кровноосне русло шляхом проколу яремної вени на межі верхньої і середньої третини шиї. Після цього також фасцію і шкіру зашивали синтетичним поліфіламентним розсмоктувальним шовним матеріалом Вікріл. Тваринам 3-ої дослідної групи призначали традиційне лікування травми, а саме:

1) хірургічний метод: накладання 2-вузлових швів на місце розриву м'язової тканини, фасцію та шкіру зашивали синтетичним поліфіламентним розсмоктувальним шовним матеріалом Вікріл, м'язову тканину зшивали розсмоктувальним матеріалом (плетеним Chirasorb braided);

2) медикаментозний метод: місце, де зашивали рану, змастили 0,5 мл хірургічного клею Дермабонд. Внутрішньом'язово вводили антибіотик цефтриаксон в дозі 0,2 мл/кг маси тіла тварини одноразово на добу протягом 5-ти діб та тилозин 5 % по 6 мл/1 тварину одноразово на добу протягом 5-ти діб.

Тваринам 4 дослідної групи (контрольної) вводили внутрішньовенно 0,9 % розчин натрію хлориду. Крім того, була 5-та дослідна група – інтактні тварини.

Зразки біологічного матеріалу для лабораторних досліджень відбирали у вихідному стані (перед початком) та на 4, 7, 10, 14, 21 та 28-у добу проведення досліду. Для отримання зразків крові для лабораторних досліджень тварину фіксували, натягували шкіру в ділянці проходження яремної вени на межі верхньої й середньої третини шиї, голова тварини була відведена в іншу сторону. Проводили пункцію шляхом проколювання голкою шкіри (вводячи голку по току крові під кутом 45 °) та стінки вени. Відібрану свіжу кров поміщали в пробірку із коагулянтном. Біохімічні дослідження проводили у ветеринарній лабораторії «Бальд».

Гістологічні дослідження проводили на базі кафедри анатомії, гістології і патоморфології тварин ім. акад. В.Г. Касьяненка НУБіП України. Досліджувані зразки м'язів фіксували в 10 % формаліні, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації, заливку матеріалу проводили в гомогенізовану парафінову суміш фірми «Histomix».

Статистичний аналіз усіх результатів здійснювали за методами варіаційної статистики в програмі Statistica 10.0. («Statsoft Inc.», США). Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок використовували t-критерій Стьюдента. Вірогідними вважалися відмінності при $p \leq 0,05$, що є загальноприйнятими у біологічних дослідженнях. Результати представлено як середнє арифметичне \pm похибка середнього ($M \pm m$) (Stadnyk et al., 2021).

Результати й обговорення. Калій (K⁺) – це основний позитивно заряджений іон внутрішньоклітинного середовища. Калій присутній у всіх тканинах організму і необхідний для нормальної роботи клітин через його роль у підтримці обсягу внутрішньоклітинної рідини та трансмембранних електрохімічних градієнтів. Калій має сильний зв'язок із Натрієм, головним регулятором об'єму позаклітинної рідини, включаючи об'єм плазми. Калій є одним з найважливіших внутрішньоклітинних іонів, що бере участь у різноманітних функціях організму – скороченні м'язів, підтримці водного балансу, регуляції обмінних процесів білкового та вуглеводного (Utomo et al. (2018).

Референтні значення Калію в крові кролів знаходяться на рівні 3,6–5,2 ммоль/л. Зменшення концентрації Калію в сироватці спостерігається при зниженні надходження з кормами, втраті через шлунково-кишковий тракт, посиленій екскреції нирками, травмі м'язів, хвороби нирок, стрес, що характеризуються поліурією.

Результати дослідження рівня Калію в крові кролів, пов'язані із активністю регенерації експериментально ушкодженої м'язової тканини в різні періоди досліду, наведені в таблиці.

Таблиця

Рівень Калію в крові кролів після застосування МСК для стимуляції міогенезу в експериментально ушкодженій м'язовій тканині, Ммоль/л, M±m, n=3

Групи тварин	Вихідний стан	Після застосування МСК					
		4 доба	7 доба	10 доба	14 доба	21 доба	28 доба
Введення МСК в м'язи	3,9 ± 1,08	3,66 ± 1,25**	4,15 ± 1,11**	5,13 ± 0,89*	3,55 ± 1,29*	4,47 ± 1,03*	5,00 ± 0,92*
Введення МСК в кров		1,99 ± 2,3***	3,37 ± 1,36**	3,96 ± 1,16**	5,18 ± 0,88**	4,99 ± 0,92**	5,13 ± 0,89
Традиційне лікування		0,72 ± 6,4*	1,6 ± 2,88	2,26 ± 2,03	3,7 ± 1,24	3,6 ± 1,28*	4,1 ± 1,12
Контроль		0,6 ± 7,6*	1,12 ± 4,11	1,28 ± 3,6	3,45 ± 3,17	2,99 ± 1,54	3,12 ± 4,47
Інтактні тварини		4,61 ± 1,9	5,1 ± 0,98**	4,9 ± 0,94**	5,0 ± 0,92**	4,76 ± 4,96**	3,99 ± 1,15**

Примітка. * - P<0,05; ** - P<0,01; *** - P<0,001

Як відомо, зменшення концентрації Калію у крові спостерігається при гострій та хронічній нирковій недостатності, що супроводжується олігурією та анурією, гіпофункції надниркових залоз, а також за посиленого розпаду клітин (опіки, некрози, пухлини, перитоніт, м'язові травми тощо).

Найнижчий рівень Калію в крові тварин відмічений протягом всього періоду спостережень в I дослідній групі, що дає підстави робити висновок про достовірну найвищу ефективність алогенних МСК, трансплантованих безпосередньо в зону запалення.

На другому місці за ефективністю залишається II група тварин, яким вводили МСК внутрішньовенно.

Традиційний метод лікування експериментально ушкодженого м'яза достовірно займає третє місце, що свідчить про важкі наслідки для організму нанесеної травми такого характеру без надання лікувальної допомоги.

Звертає увагу на себе динаміка показників в проміжний період спостережень між 4 та 28 добою. Зокрема, у тварин I і II дослідних груп рівень Калію в крові вже на 7 добу наблизився до референтних значень, в той час як у тварин III дослідної групи (традиційне лікування) цей показник лише наблизився, але не досяг такого рівня лише на 14 добу. Це свідчить про суттєво нижчу активність регенеративних процесів у експериментально ушкодженій м'язовій тканині.

ВИСНОВКИ

1. Застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин для стимуляції процесів відновлення експериментально ушкоджених м'язів дозволяє значно прискорити відновлення ушкодженої ділянки за рахунок заповнення дефекту повноцінними клітинами м'язової тканини.

2. Результатами досліджень підтверджено, що Калій є одним з важливих внутрішньоклітинних мінералів, який бере участь у різноманітних функціях організму – скороченні м'язів і в регулюванні скорочення м'язів.

3. Швидкість та порядок відновлення ушкодженої м'язової тканини за допомогою трансплантованих алогенних МСК залежить від способу їх уведення. Місцеві (інтрамускулярні) ін'єкції МСК дають вищий результат, ніж внутрішньовенні ін'єкції.

Перспективи досліджень. В майбутньому плануються проведення порівняльних дослідів та клінічних випробувань щодо лікування мезенхімальними стовбуровими клітинами у випадках спонтанних ушкоджень м'язів для розробки протоколів лікування тварин з подібними формами патології.

References

De Lima Santos, A, Silva, C.G.D., de Sa Barretto, L.S. et al. (2019). Biomechanical assessment of tendon regeneration with adipose stem cells. 37 (06).1281-1286.

Freitag, J, Bates, D, Wickham, J. et al. (2019). Medical therapy with mesenchymal stem cells in the fat pad in the treatment of osteoarthritis of the knee joint: a randomized controlled trial. Regen Med; 14 (03) 213-230.

Han, X, Yang, B, Zou, F, Sun, J. (2020). Clinical therapeutic efficacy of adipose or bone marrow-derived mesenchymal stem cells in knee osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. J Comp Eff Res 9 (05) 361-374.

Percie du Sert, N, Ahluwalia, A, Alam, S. et al. (2020). Animal Research Report: Explanation and Development of ARRIVE 2.0 Guidelines. PLoS Biol; 18 (07) e3000411.

Utomo, D.N., Mahyudin, F, Hernugrahanto K.D., et al. (2018). Implantation of platelet-rich fibrin and allogeneic mesenchymal stem cells promotes healing of muscle trauma: an experimental study in animals. Int J Surg Open.1: 4-9.

Stadnyk, N.V., Bokotko, R.R., Savchuk, T.L. et al. (2021). Serum creatine phosphokinase activity in rabbits during regeneration of experimentally damaged muscle tissue and after its stimulation by transplanted MSC <https://doi.org/10.31548/ujvs2021.04.010>.