

*Ю.В. МІНІН, П.А. ВІРИЧ, А.Ф. КАРАСЬ, С.П. ЧАЙКА, Г.А. КАРАСЬ,  
Н.С. ШУВАЛОВА, Т.І. КУЧЕРЕНКО*

## **РЕГЕНЕРАЦІЯ ШТУЧНИХ ПОШКОДЖЕНЬ ЕЛАСТИЧНОГО ХРЯЩА ЗОВНІШНЬОГО ВУХА КРОЛИКІВ ПІСЛЯ ЛОКАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН**

*ДУ “Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України”  
(дир. – акад. НАМН України, проф. Д.І. Заболотний)*

Щорічно близько мільйона пацієнтів розвинених країн звертаються до хірургічних відділень з проблемами реконструкції хряща вушної раковини [2]. Хрящі мають низьку регенераційну здатність через відсутність судин та нервів. Це обмежує проліферативний потенціал хондроцитів та каталітичну відповідь на патологічні медіатори.

Для відновлення хряща розроблено різні хірургічні процедури, але вони залежать від техніки та спрямовані на виправлення незначних дефектів [4, 7, 11]. Альтернативні підходи реконструкції хрящів базуються на використанні біосумісних матриць, виготовлених з полімерних матеріалів різного походження: природних колагену [5], хітозану [8], альгінату [19], агарози [9] та інших [16], а також синтетичних аналогів [3, 17, 20]. Регенерація потребує наявності стовбурових клітин, які походять як з власне хряща, так і вводяться зовні у вигляді ін'єкцій чи інтегруються безпосередньо у полімерну матрицю. За умови незначних пошкоджень відсутня потреба у каркасах. Введення клітин у місце пошкодження забезпечує можливість повного відновлення цілісності хрящів.

Однією з найскладніших частин процесу застосування стовбурових клітин у клінічній практиці є контролювання їх проліферативного потенціалу та диференціації. В окремих випадках відбувається їх онкологічне переродження. Завдяки поліпотентності, навіть незначні зміни мікрооточення

призводять до аномальної диференціації, що знижує ефективність лікування [6].

Стовбурові клітини можуть застосовуватись з метою відновлення дефектів еластичного хряща [15]. Додавання до них основного фактору росту фібробластів (basic fibroblast growth factor – bFGF) забезпечує ініціацію проліферативних процесів *in vivo* у перихондрії [18]. Зміни можуть зберігатися протягом 3 місяців з моменту введення bFGF, а новоутворений хрящ з'являється через 2 тижні. Контролювати процес можливо введенням антитіл до фактору росту фібробластів. Через 3 місяці морфологічні зміни були незворотними [18].

Перевагою методу є відсутність імунних реакцій на імплантат чи реконструктивні матеріали, потенційно повне відновлення дефектів хряща, що не потребує додаткових інвазивних процедур. Клітини можуть вводитися в місце дефекту ін'єкційно або з мінімальними пошкодженнями шкірного покриву. Завдяки такому підходу можлива малоінвазивна реконструкція хрящів з мінімізацією побічних ефектів. Тим не менш, спектр застосування стовбурових клітин та їх проліферація після таких процедур є малодослідженою проблемою. Вирішення цього питання має важливе значення для лікування та відновлення хрящової тканини.

**Мета роботи:** з'ясування особливостей регенерації штучного дефекту еластичного хряща вуха кролів після ін'єкції стовбурових клітин.

### **Матеріали та методи дослідження**

Дослідження проведено на кролях породи шиншила віком 1,5 міс, масою 2,5 кг, що утримувалися у стандартних умовах віварію Державної установи «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка Національної академії медичних наук України». В дослідженнях було задіяно 24 тварини, з яких 9 склали контрольну групу та 15 – дослідну. Всі маніпуляції з тваринами проводились з дотриманням норм Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Міжнародної конвенції про роботу з лабораторними тваринами.

Тварини вводились в стан загальної анестезії комбінацією препаратів дексметомідин 0,25 мг/кг та кетамін 35 мг/кг. На хрящовій пластинці зовнішнього вуха скальпелем моделювали штучне пошкодження розміром 2х7-10 мм. У місце дефекту проводили ін'єкцію 0,5 мл суспензії (~5 млн) стовбурових клітин, отриманих з пуповинного канатика кролів ензиматичним методом. Шкіру над дефектом зашивали. В контрольній групі в місце пошкодження вводили фізіологічний розчин аналогічного об'єму.

Забір матеріалу проводився через 2 та 3 міс після операції. Тварини вводились в стан загальної анестезії. Скальпелем вирізали ділянку дефекту з оточуючими тканинами, поміщали у фізіологічний розчин та відмивали від залишків крові. Зразки очищали від шкіри, готували гістологічні зрізи на мікромі-кріостаті Microm HM 525 (Німеччина) при -30 °C перпендикулярно площині хряща товщиною 10 мкм. Отримані гістологічні зрізи фарбувались згідно загальноприйнятих методів за Вейгертом, ван Гізон та азур II-еозином.

Дослідження препаратів проводилось з використанням мікроскопу Olympus BX53 з камерою-детектором Olympus DP72 при збільшеннях x100 та x200. Умови фотографування гістологічних зрізів: роздільна здатність – 4140х3096, чутливість – ISO 800, тривалість експозиції – 15 мс. Оцінка інтенсивності забарвлення окремих тканин проводилась за допомогою програмного забезпечення Image J 1.52 (National Institutes of Health, University of Wisconsin, USA) відносно контрольних вимірів інтенсивності за-

барвлення сполучної тканини того ж препарату для нівеляції різниці забарвлення між гістологічними зрізами [1].

Оцінка щільності колаген-еластинової сітки тканини в межах дефекту хряща проводилась відносно дерми, що присутня на гістологічному зрізі. Шкала градації сірого знаходилася в межах 0-255 у.о., де 0 – чорний колір, 255 – білий. Відповідно отриманих значень, відносна щільність сітки зростатиме по мірі зниження значень шкали сірого.

Фарбування азур II-еозином дозволяє визначити базofilні (синій колір) та оксифілі (червоний колір) елементи тканин. Аналізувалась інтенсивність синього та червоного забарвлення тканини, що відповідало відносній кількості оксифілічних та базofilічних елементів. Розраховувались медіанні значення та рахували відношення оксифілічних (основних) і базofilічних (кислих) елементів тканин.

### **Результати дослідження та їх обговорення**

Міжклітинний матрикс має індивідуальні особливості для кожної тканини. Основні його складові – колаген та еластин, визначають міцність тканини в цілому. Біохімічні характеристики цих елементів є індивідуальними та характеризують різні типи тканин. Кількість волокон є визначальною за структурно-механічною точкою зору. Хрящова тканина характеризується високою щільністю колаген-еластинової сітки з малою присутністю клітин, що забезпечує її міцність та еластичність. Це відрізняє її від тканин рубців та дерми.

Оцінка відносної кількості колагенових волокон проводилась програмно після обробки зображень гістологічних зрізів, пофарбованих за методом Вейгерта. Щільність сітки визначається за градацією шкали сірого з урахуванням, що 0 – це найвища, а 255 – найменша. Порівняння відносної кількості волокон нативного еластичного хряща вуха кроля та дерми навколо нього вказують, що для хряща показник вище на 35% (рис. 1).

Аналіз результатів виявив, що через 2 місяці після хірургічного втручання новосформовані тканини у місці дефекту схожі за

характеристиками до дерми. Таким чином, відновлення штучного пошкодження еластичного хряща характеризувалось формуванням щільної сполучної тканини рубця.

Зважаючи на отримані дані, можна припустити, що мікрооточення стовбурових

клітин ініціює їх диференціацію за класичними механізмами регенерації сполучної тканини. Аналогічні результати виявлено у зоні штучного дефекту еластичного хряща через 3 міс. після операції (рис. 1).

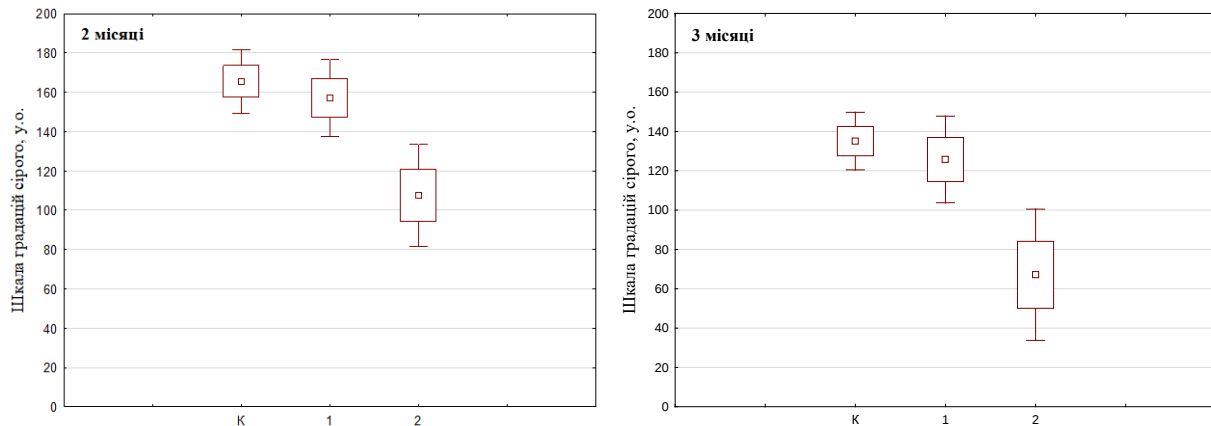


Рис. 1. Щільність колаген-еластинової сітки тканин зовнішнього вуха кроля в місці штучного дефекту через 2 та 3 міс. К – контроль, сполучна тканина – дерма, 1 – тканина в місці пошкодження еластичного хряща, 2 – нативний еластичний хрящ (зростання щільності колаген-еластинової сітки за шкалою градаций сірого від 255 до 0 у.о.;  $M \pm SD$ ,  $n=10$ ). Фарбування за Вейгертом.

Ін'єкційне додавання стовбурових клітин в місце дефекту забезпечує зростання гетерогенності новоутвореної колаген-еластинової сітки, але не сприяє регенерації хрящової тканини. Можна припустити, що проліферація клітин відбувається на ранніх етапах регенерації, яка і визначає подальший тип новоутвореної тканини.

У процесі проліферації стовбурових клітин важливе значення має формування необхідного мікрооточення, яке сприяє активації або супресії ряду генетичних регуляторів. Вони визначають шлях проліферації полі/тотипонетних клітин та кінцевий результат їх диференціації [12, 13].

Таким чином, для спрямування напрямку проліферації стовбурових клітин до утворення хондроцитів необхідне додавання регуляторних факторів або їх заключення у сприятливе для цього середовище, наприклад буферні розчини або гелі із вмістом гіалуронової кислоти, глікозаміногліканів, тощо.

Важливе значення при регенерації сполучної тканини відіграють кислі мукополісахариди [14, 21]. Вони є одним з мар-

керів хрящової тканини і формують частковий негативний заряд міжклітинного матриксу. Відносну кількість оксифільних та базифільних елементів тканин можливо визначити завдяки специфічній взаємодії барвника азуру II з кислими (синє забарвлення) та основними (червоне забарвлення) елементами. Їх відношення частково вказуватиме на тип тканини.

Виявлено, що нативний хрящ на гістологічних зрізах практично не виявляє оксифільної реакції або її маскує значна кількість кислих компонентів (рис. 2). Щільна сполучна тканина містить практично рівну кількість обох складових. Таким чином, можна прослідковувати зміни у міжклітинному матриксі, які визначатимуть напрямок регенераційного процесу. Зона дефекту еластичного хряща через 2 міс. після додавання стовбурових клітин характеризувалась значною присутністю оксифільних елементів (рис. 2).

Відношення оксифільних і базифільних елементів у еластичному хрящі наближається до нуля.

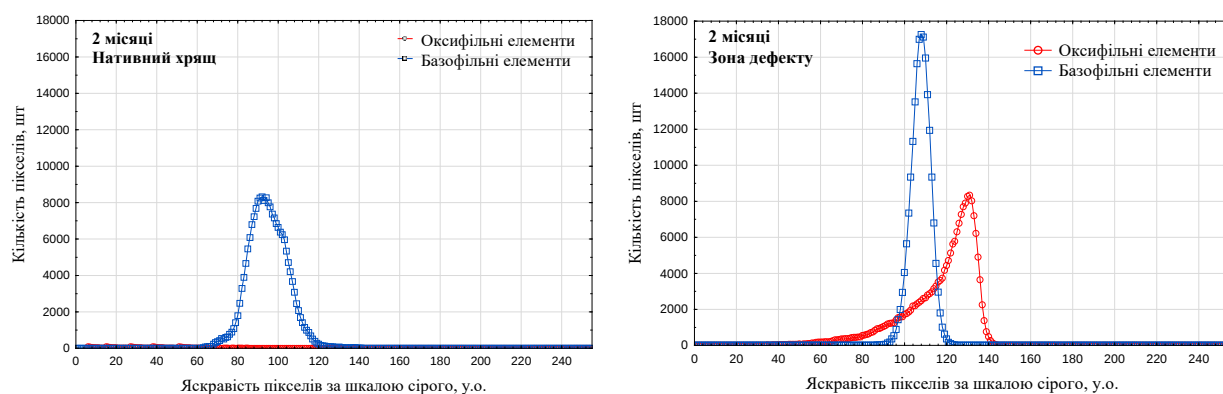


Рис. 2. Відносна кількість базофільних (синя крива) та оксифільних (червона крива) елементів нативного та пошкодженого еластичного хряща кролів після додавання стовбурових клітин. Термін спостереження – 2 міс. Забарвлення азур II-еозином.

Відносно цього значення ми відштовхувалися при аналізі тканин, які заповнювали місце дефекту. Для дерми показник становить 1,4-1,5. Щільна сполучна тканина рубця характеризується відношенням, близьким до одиниці (табл. 1).

Аналогічні характеристики тканин отримано при аналізі зразків тканин зони дефекту еластичного хряща зовнішнього вуха кролів через 3 міс. після ін'єкції стовбурових клітин (табл. 2). Тому ми вважаємо, що при нормальній регенерації хрящової тканини відбувається формування базофільного міжклітинного матриксу, який значно переважатиме оксифільні компоненти.

Зважаючи на отримані результати, ми припускаємо, що напрямок проліферації

клітин визначається у короткий термін після ін'єкції. Пошкодження тканин супроводжується вивільненням ряду біологічно активних молекул: факторів росту, медіаторів запалення та цитокінів. Останні є визначальними при формуванні типу тканини та розвитку міжклітинного матриксу [10]. При регенерації тканини відбувається зміна типу колагену. Для щільної сполучної тканини характерний тип 1, який змінює тип 3. Всі ці процеси у комплексі визначають спосіб відновлення цілісності зони пошкодження тканин. Стовбурові клітини в умовах насичення прозапальними медіаторами, цитокінами та наявністю тотипотентних клітин дерми не здатні диференціюватися у хондроласти та хондроцити.

Таблиця 1

Відношення базофільних та оксифільних компонентів тканин в області пошкодження еластичного хряща зовнішнього вуха кроля через 2 міс. після ін'єкції стовбурових клітин

| Групи тварин | Тканина          | Інтенсивність забарвлення за шкалою сірого, у.о. (медіана) |                         | Відношення О/Б |
|--------------|------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------|
|              |                  | базофільні елементи (Б)                                    | оксифільні елементи (О) |                |
| Контрольна   | Нативний хрящ    | 37                                                         | 3                       | 0,08           |
|              | Пошкоджений хрящ | 145                                                        | 168                     | 1,15           |
|              | Дерма            | 146                                                        | 198                     | 1,35           |
| Дослідна     | Нативний хрящ    | 94                                                         | 19                      | 0,2            |
|              | Пошкоджений хрящ | 107                                                        | 117                     | 1,09           |
|              | Дерма            | 85                                                         | 131                     | 1,54           |

Таблиця 2

Відношення базофільних та оксифільних компонентів тканин в області пошкодження еластичного хряща зовнішнього вуха кроля через 3 міс. після ін'єкції стовбурових клітин

| Групи тварин | Тканина          | Інтенсивність забарвлення за шкалою сірого, у.о. (медіана) |                                   | Відношення Ч/С |
|--------------|------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------|
|              |                  | базофільні елементи, синій (С)                             | оксифільні елементи, червоний (Ч) |                |
| Контрольна   | Нативний хрящ    | 58                                                         | 6                                 | 0,1            |
|              | Пошкоджений хрящ | 94                                                         | 75                                | 0,79           |
|              | Дерма            | 96                                                         | 106                               | 1,1            |
| Дослідна     | Нативний хрящ    | 87                                                         | 25                                | 0,28           |
|              | Пошкоджений хрящ | 127                                                        | 110                               | 0,86           |
|              | Дерма            | 126                                                        | 140                               | 1,11           |

### Висновки

Додавання стовбурових клітин в область штучно створеного дефекту еластичного хряща вуха кроля не дозволяє отримати стійкі регенераційні процеси хрящової тканини та відновлення міжклітинного матриксу до вихідного стану. Процеси дифере-

нціації клітин відбуваються у напрямку формування щільної сполучної тканини рубця, що може бути обумовлено присутністю прозапальних цитокінів, факторів росту та інших біологічно активних молекул, які не сприяють формуванню необхідного мікрооточення для регенерації хрящової тканини.

### Література

1. Brianezi G, Grandi F, Bagatin E, Enokihara MM, Miot HA. Dermal type I collagen assessment by digital image analysis. *An Bras Dermatol*. 2015; 90(5):723-7. doi:10.1590/abd1806-4841.20153331
2. 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):793-801. doi: 10.1097/01.PRS.0000069711.31021.94
3. Chen C, Huang K, Zhu J, Bi Y, Wang L, Jiang J, Zhu T, Yan X, Zhao J. A novel elastic and controlled-release poly(ether-ester-urethane)urea scaffold for cartilage regeneration. *J Mater Chem B*. 2020;18(8):4106-21. doi:10.1039/c9tb02754h.
4. Ciorba A, Martini A. Tissue engineering and cartilage regeneration for auricular reconstruction. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2006;70(9):1507-15. doi:10.1016/j.ijporl.2006.03.013.
5. de Chalain T, Phillips JH, Hinek A. Bioengineering of elastic cartilage with aggregated porcine and human auricular chondrocytes and hydrogels containing alginate, collagen, and kappa-elastin. *J Biomed Mater Res*. 1999;44(3):280-8. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(19990305)44:3<280::aid-jbm6>3.0.co;2-h.
6. Ebrahimi A, Ahmadi H, Pourfraidon Ghasroldashti Z, Tanide N, Shahriarirad R, Erfani A, Ranjbar K, Ashkani-Esfahani S. Therapeutic effects of stem cells in different body systems, a novel method that is yet to gain trust: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci*. 2021;21(6):672-701. doi: 10.17305/bjbm.2021.5508.
7. Fosang AJ, Beier F. Emerging Frontiers in cartilage and chondrocyte biology. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2011;25(6):751-66. doi: 10.1016/j.berh.2011.11.010.

8. García-López J, Garciadiego-Cázares D, Melgarejo-Ramírez Y, Sánchez-Sánchez R, Solís-Arrieta L, García-Carvajal Z, Sánchez-Betancourt JI, Ibarra C, Luna-Bárcenas G, Velasquillo C. Chondrocyte differentiation for auricular cartilage reconstruction using a chitosan based hydrogel. *Histol Histopathol.* 2015;30(12):1477-85. doi: 10.14670/HH-11-642.
9. García-Martínez L, Campos F, Godoy-Guzmán C, Del Carmen Sánchez-Quevedo M, Garzón I, Alaminos M, Campos A, Carriel V. Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in nanostructured fibrin-agarose hydrogels. *Histochem Cell Biol.* 2017;147(1):83-95. doi: 10.1007/s00418-016-1485-9.
10. Grubbs H, Manna B. Wound Physiology. 2021. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
11. Hou M, Tian B, Bai B, Ci Z, Liu Y, Zhang Y, Zhou G, Cao Y. Dominant role of in situ native cartilage niche for determining the cartilage type regenerated by BMSCs. *Bioact Mater.* 2021; 13:149-160. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.11.007.
12. Jayasuriya CT, Chen Y, Liu W, Chen Q. The influence of tissue microenvironment on stem cell-based cartilage repair. *Ann N Y Acad Sci.* 2016; 1383(1):21-33. doi: 10.1111/nyas.13170.
13. Jessop ZM, Javed M, Otto IA, Combelleck EJ, Morgan S, Breugem CC, Archer CW, Khan IM, Lineaweaver WC, Kon M, Malda J, Whitaker IS. Combining regenerative medicine strategies to provide durable reconstructive options: auricular cartilage tissue engineering. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7:19. doi: 10.1186/s13287-015-0273-0.
14. Khan S, Alméciga-Díaz CJ, Sawamoto K, Mackenzie WG, Theroux MC, Pizarro C, Mason RW, Orii T, Tomatsu S. Mucopolysaccharidosis IVA and glycosaminoglycans. *Mol Genet Metab.* 2017; 120(1-2):78-95. doi: 10.1016/j.ymgme.2016.11.007.
15. Kobayashi S, Takebe T, Inui M, Iwai S, Kan H, Zheng YW, Maegawa J, Taniguchi H. Reconstruction of human elastic cartilage by a CD44+ CD90+ stem cell in the ear perichondrium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(35):14479-84. doi: 10.1073/pnas.1109767108.
16. Li L, Yu F, Zheng L, Wang R, Yan W, Wang Z, Xu J, Wu J, Shi D, Zhu L, Wang X, Jiang Q. Natural hydrogels for cartilage regeneration: Modification, preparation and application. *J Orthop Translat.* 2018;17:26-41. doi: 10.1016/j.jot.2018.09.003.
17. Min SH, Kim JH, Lee MI, Kwak HH, Woo HM, Shim JH, Choi DM, Lee JS, Jeong JY, Kang BJ. Evaluation of Auricular Cartilage Reconstruction Using a 3-Dimensional Printed Biodegradable Scaffold and Autogenous Minced Auricular Cartilage. *Ann Plast Surg.* 2020;85(2):185-193. doi: 10.1097/SAP.0000000000002313.
18. Miyanaga T, Ueda Y, Miyanaga A, Yagishita M, Hama N. Angiogenesis after administration of basic fibroblast growth factor induces proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells in elastic perichondrium in an in vivo model: mini review of three sequential republication-abridged reports. *Cell Mol Biol Lett.* 2018;23:49. doi: 10.1186/s11658-018-0113-1.
19. Rastogi P, Kandasubramanian B. Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering. *Biofabrication.* 2019;11(4): 042001. doi: 10.1088/1758-5090/ab331e.
20. Stephan S, Reinisch J. Auricular Reconstruction Using Porous Polyethylene Implant Technique. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2018;26(1):69-85. doi: 10.1016/j.fsc.2017.09.009.
21. Vynios DH. Metabolism of cartilage proteoglycans in health and disease. *Biomed Res Int.* 2014;2014:452315. doi: 10.1155/2014/452315.

Надійшла до редакції 26.05.2022

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

## РЕГЕНЕРАЦІЯ ШТУЧНИХ ПОШКОДЖЕНЬ ЕЛАСТИЧНОГО ХРЯЩА ЗОВНІШНЬОГО ВУХА КРОЛИКІВ ПІСЛЯ ЛОКАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

Мінін ЮВ, Вірич ПА, Карась АФ, Чайка СП, Карась ГА, Шувалова НС, Кучеренко ТІ

Державна установа «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка

Національної академії медичних наук України»,

м. Київ, Україна

Email: sphaenodon@ukr.net

### А н о т а ц і я

**Актуальність:** Щорічно велика кількість пацієнтів розвинених країн звертається до хірургічних відділень з проблемами реконструкції хряща вушної раковини. Через низьку регенераційну здатність еластичного хряща розроблено ряд хірургічних процедур, які спрямовані на виправлення незначних дефектів. Перспективним напрямком є використання стовбурових клітин, які потенційно можуть диференціюватися у хондробласти і хондроцити та відновлювати цілісність хряща. Але можливості такого підходу мало вивчені через велику кількість факторів, що визначають напрямок диференціації клітин. Тому, дослідження можливостей застосування стовбурових клітин з метою відновлення еластичного хряща є актуальним.

**Мета роботи:** з'ясування особливостей регенерації штучного дефекту еластичного хряща вуха кролів після ін'єкції стовбурових клітин.

**Матеріали і методи:** Дослідження проведено на кролях породи шиншила віком 1,5 міс, масою 2,5 кг. На хрящовій пластинці зовнішнього вуха скальпелем моделювали штучні пошкодження розмірами 2x7-10 мм. У місце дефекту проводили ін'єкцію 0,5 мл суспензії (~5 млн) стовбурових клітин, отриманих з пуповинного канатика кролів ензиматичним методом. Готували гістологічні зрізи місця штучного дефекту хряща. Зразки фарбувались за методами Вейгерта та азур II. Програмно оцінювалась відносна щільність колагенових, еластинових волокон, оксифільних і базофільних елементів тканини.

**Результати та їх обговорення:** Порівняння відносної кількості волокон нативного еластичного хряща вуха кроля та дерми навколо нього вказують, що для хряща показник вище на 35%. Аналіз виявив, що через 2 міс. після хірургічного втручання новосформовані тканини у місці дефекту схожі за характеристикам до дерми. Аналогічні результати виявлено у зоні штучного дефекту еластичного хряща через 3 міс. після операції. Виявлено, що нативний хрящ на гістологічних зрізах практично не виявляє оксифільної реакції або її маскує значна кількість кислих компонентів. Щільна сполучна тканина містить практично рівну кількість обох складових. Таким чином, можна прослідковувати зміни у міжклітинному матриксі, які характеризуватимуть напрямок регенераційного процесу. Зона дефекту еластичного хряща через 2 місяці після додавання стовбурових клітин характеризується значною присутністю оксифільних елементів. Відношення оксифільних і базофільних елементів у еластичному хрящі наближається до нуля. Для дерми показник становить 1,4-1,5. Щільна сполучна тканина рубця характеризується відношенням близьким до 1. Зважаючи на отримані результати, ми припускаємо, що напрямок проліферації клітин визначається у короткий термін після ін'єкції.

**Висновки:** додавання стовбурових клітин в область штучно створеного дефекту еластичного хряща вуха кроля не дозволяє отримати стійкі регенераційні процеси хрящової тканини та відновлення міжклітинного матриксу до вихідного стану. Процеси диференціації клітин відбуваються у напрямку формування щільної сполучної тканини рубця, що може бути обумовлено присутністю прозапальних цитокінів, факторів росту та інших біологічно активних молекул, які не сприяють формуванню необхідного мікроочередня для регенерації хрящової тканини.

**Ключові слова:** стовбурові клітини, еластичний хрящ, регенерація.

## REGENERATION OF ARTIFICIAL INJURIES EXTERNAL EAR ELASTIC CARTILAGE OF RABBITS AFTER STEM CELLS LOCAL INJECTION

Minin YuV, Virych PA, Karas AF, Chaika SP, Karas GA, Shuvalova NS, Kucherenko TI

State Institution "O.S. Kolomiychenko Institute of Otolaryngology  
of National Academy of Medical Science of Ukraine"

Email: sphaenodon@ukr.net

### Abstract

**Introduction:** Every year, a large number of patients from developed countries turn to surgical departments with the reconstruction problems of the auricle cartilage. A some of surgical procedures was developed to correct minor defects due to the low regenerative capacity of elastic cartilage. Stem cells can potentially differentiate into chondroblasts and chondrocytes and restore cartilage integrity. Many factors influence on the differentiation and proliferation of stem cells, which complicates the method application. Therefore, the investigation of using stem cells to regeneration elastic cartilage is relevant.

**Aim:** clarification the regeneration features of the artificial defect of the rabbits' ear elastic cartilage after the stem cells injection.

**Materials and methods:** The investigation was conducted on rabbits of chinchilla breed aged 1.5 months, weighing 2.5 kg. Artificial lesions measuring 2 x 7-10 mm were simulated on the cartilaginous plate of the outer ear with a scalpel. 0.5 ml of stem cell suspension (~5 million) obtained from the umbilical cord of rabbits by enzymatic method was injected into the defect site. Histological sections of the cartilage defect were prepared. The samples were stained by Weigert and Azure II methods. The relative density of collagen, elastin fibers, oxyphilic and basophilic tissue elements was programmatically evaluated.

**Results and discussion:** The amount of fibers in the native elastic cartilage was more on 35% of the relative dermis. The newly formed tissues at the damage cartilage was like to the dermis after 2 months. Similar results were found on ear in 2.5 and 3 months after surgery. Native cartilage on histological sections almost was not oxyphilic. Maybe a significant number of acidic components was masked it. Dense connective tissue contains almost equal amounts of both components. Thus, it is possible to trace changes in the intercellular matrix that will characterize the direction of the regeneration process. The area of elastic cartilage defect was characterized by a significant presence of oxyphilic elements after 2 months of the stem cells addition. The ratio of oxyphilic and basophilic components in the native elastic cartilage was about to zero. For the dermis was 1.4-1.5. Dense scar connective tissue was characterized by a ratio about 1. Based on the results obtained, was assumed that the direction of stem cell proliferation is determined shortly after injection.

**Conclusion:** The addition of stem cells to the area of the artificially created elastic cartilage defect of the rabbit's ear was not allow to obtain stable regenerative processes of cartilage tissue and the restoration of the intercellular matrix to its original state.

The process of stem cell differentiation contributes the formation of dense connective tissue of the scar, which may be due to the presence of proinflammatory cytokines, growth factors and other biologically active molecules. This was not creating the necessary conditions for the cartilage regeneration.

**Key words:** stem cells, elastic cartilage, regeneration.