

Model doświadczalnej tendinopatii z użyciem kolagenazy bakteryjnej

Marta Facon-Poroszewska

z Katedry Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Tendinopatie są częstym problemem medycznym u ludzi i zwierząt. Urazy ścięgien, więzadeł i pochewek stawów mogą stanowić aż 45% urazów układu mięśniowo-szkieletowego u ludzi (1). W medycynie sportowej aż 30–40% przypadków stanowią przeciążeniowe urazy ścięgien (2). Wśród zwierząt problem tendinopatii dotyczy głównie gatunków, takich jak konie i psy, u których tego rodzaju zmiany patologiczne związane są z intensywnym wysiłkiem i treningiem (3). Według statystyk wśród koni wyścigowych pełnej krwi angielskiej urazy ścięgna mięśnia zginacza powierzchownego palców stanowią od 8 do 30% wszystkich kontuzji ortopedycznych (4, 5), natomiast w ogólnym ujęciu na podstawie danych z 2008 r. średni odsetek zapaleń ścięgien utrzymuje się na poziomie 10% w stosunku do ogółu problemów weterynaryjnych tych zwierząt (6). Postępy w medycynie regeneracyjnej w zakresie leczenia tej choroby ścięgien często oparte są o wyniki badań na modelu zwierzęcym. Istnieje wiele możliwości indukowania tej patologii ścięgien *in vivo*, które histologicznie przypominają naturalnie powstałą tendinopatię. Są to między innymi iniekcje doścignowe substancji, takich jak bakteryjna kolagenaza, cytokiny, prostaglandyny czy fluorochinolony (7).

Tendinopatia indukowana bakteryjną kolagenazą produkowaną przez *Clostridium histolyticum* jest jedną z najczęstszych z wymienionych metod. Iniekcje tego enzymu przeprowadzono na gatunkach, takich jak szczur, królik, owca, koń i osioł. W artykule przedstawione są dane literaturowe dotyczące wykorzystania różnych roztworów kolagenazy u zwierząt.

U szczurów stosowano roztwory o stężeniu 0,015 mg/ml enzymu rozpuszczonego w 0,9% NaCl w ilości 0,02 ml (łącznie 0,3 mg kolagenazy) podanej do więzadła rzepki jednej kończyny (szczury o masie ciała 200–250g; 8) oraz do ścięgna Achillesa w obu kończynach miednicznych (9), a także roztwór kolagenazy w stężeniu 1mg/ml otrzymany po rozpuszczeniu w buforowanym roztworze fizjologicznym, a następnie podany w ilości 0,1 ml do prawego ścięgna Achillesa (szczury o masie ciała 180–200g; 10). Okołoścignowo szczurom podawano też 250 UI kolagenazy rozpuszczonej w 0,03 ml roztworu fizjologicznego w miejscu przyczepu ścięgna Achillesa lewej kończyny miednicznej do guza piętowego (11).

U królików o masie ciała 2,5–4 kg stosowano roztwór 0,1 ml kolagenazy zawierający 400 UI enzymu, jednak autorzy nie podali rodzaju rozpuszczalnika wykorzystanego do sporządzenia roztworu. Enzym wstrzykiwano w centralną część ścięgna Achillesa w obu tylnych kończynach (12).

Experimental model tendinopathy – a study with bacterial collagenase

Facon-Poroszewska M., Department of Immunology, Pathophysiology and Veterinary Prevention, Wrocław University of Environmental and Life Sciences

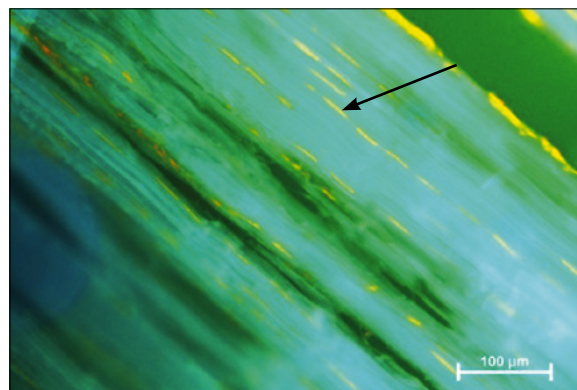
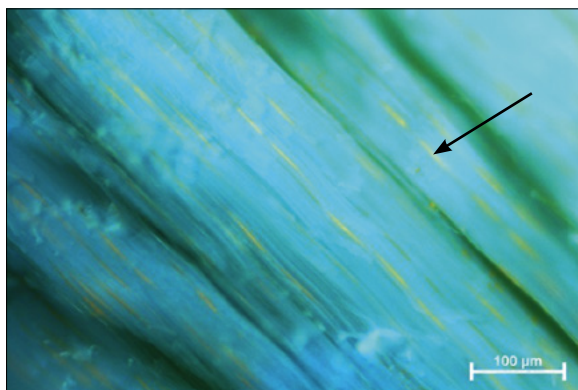
The purpose of this study was to investigate the effectiveness of different bacterial collagenase solutions for the induction of tendinopathy in laboratory animals. The search strategy was performed in the following databases: PubMed, ResearchGate, Science Direct and Wiley Online Library. Inclusion criteria was the use of bacterial collagenase type I from *Clostridium histolyticum* for induction of yatrogenic tendinopathy in animal model. Forty one articles were found relevant to this topic. Different solutions of bacterial collagenase type I were used for induction of tendinopathy and it was found that it could be effective as injury factor even in the low concentrations. Overall, the collagenase tendon injection is a safe and productive method for yatrogenic induction of tendinopathy origin.

Keywords: bacterial collagenase, tendinopathy, animal model.

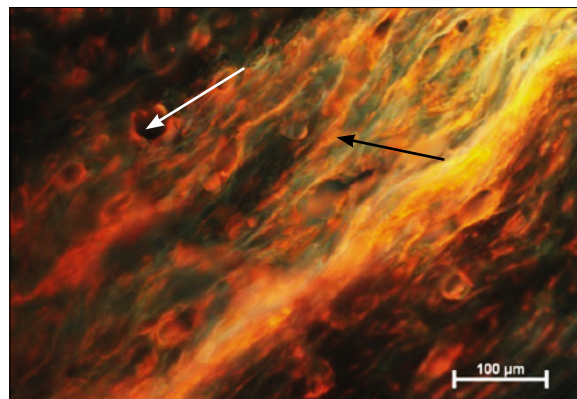
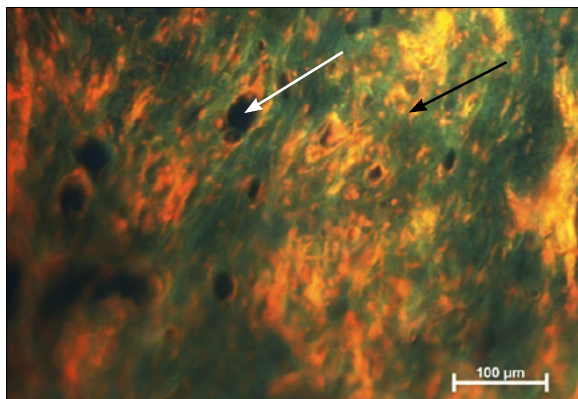
Dla owiec o masie ciała ok. 45 kg sporządzano następujące roztwory – 500 UI enzymu w 1 ml rozpuszczalnika, bez podania jego nazwy, wstrzyknięte do ścięgna mięśnia zginacza głębokiego palców w obu tylnych kończynach (13) oraz 400 UI enzymu w 1 ml w 0,9% NaCl także w formie bilateralnej iniekcji (14, 15).

Gatunkiem, u którego przeprowadzono największą liczbę badań z wykorzystaniem kolagenazy bakteryjnej w formie doścignowych iniekcji, jest koń. Prace naukowe oparte o indukowany tym enzymem model tendinopatii prowadzone są od 1984 r., kiedy pierwszy raz potwierdzono zasadność tej procedury (16). W 2009 r. opublikowano pracę porównującą przydatność do analiz naukowych dwóch modeli iniekcji enzymu. W obu przypadkach zastosowano roztwór 2,5%, przy czym jedna grupa doświadczalna otrzymała 2,5 mg kolagenazy w 1 ml rozpuszczalnika w formie iniekcji do ścięgna zginacza powierzchownego palców, a druga – 1,25 mg w objętości 0,5 ml (17). Wniosek, jaki został wysnuty na podstawie wyników badań, pozwolił na rozpoczęcie wykorzystywania pierwszej z wymienionych metod na szerszą skalę. W oparciu o indukcję tendinopatii za pomocą iniekcji doścignowej do ścięgna mięśnia zginacza powierzchownego palców 1 ml roztworu 2,5 mg kolagenazy powstało wiele prac naukowych (18, 19, 20, 21, 22, 23).

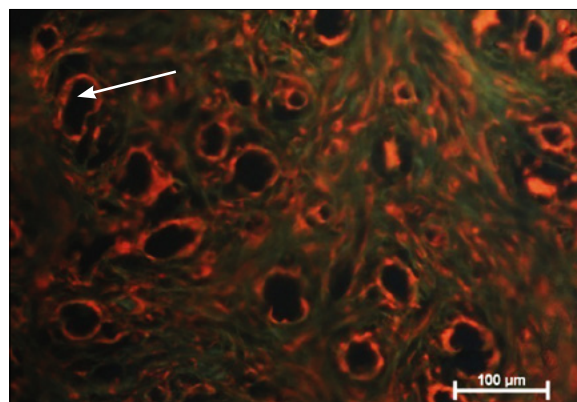
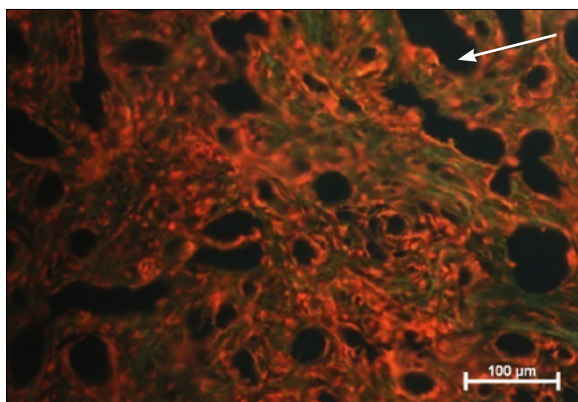
Oprócz wymienionej koncentracji roztworu u koni używane były także inne stężenia i objętości iniekcji kolagenazy, np. 2000 UI kolagenazy rozpuszczonej w 0,5 ml sterylnej wody do iniekcji podane do głowy



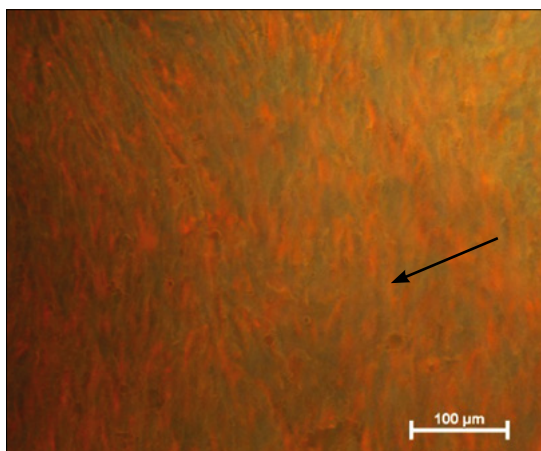
Typowy obraz ścięgna. Fibrocyty (komórki ścięgnowe) leżą pomiędzy grubymi włóknami kolagenowymi. OA 200×



Ściągno po zastosowaniu kolagenazy. Liczne komórki nieścięgnowe towarzyszą włóknom kolagenowym ścięgna. Widoczne uszkodzenia włókien kolagenowych w postaci pustych przestrzeni (biała strzałka) OA 200×

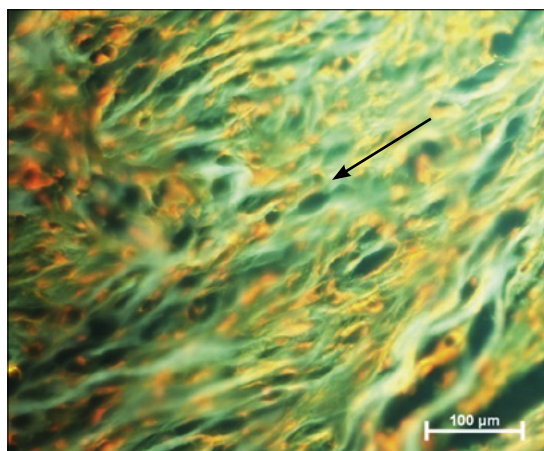


Ściągno po zastosowaniu kolagenazy. Widoczny postępujący proces degradacji włókien kolagenowych (biała strzałka). Liczne komórki ścięgnowe oraz nieścięgnowe towarzyszą włóknom kolagenowym ścięgna. OA 200×



Pochewka ścięgna po zastosowaniu kolagenazy. Liczne komórki wokół włókien kolagenowych. OA 200×

Ściągno po zastosowaniu kolagenazy. Widoczny drobny, mocno usieciowany kolagen, któremu towarzyszą fibroblasty OA 200×



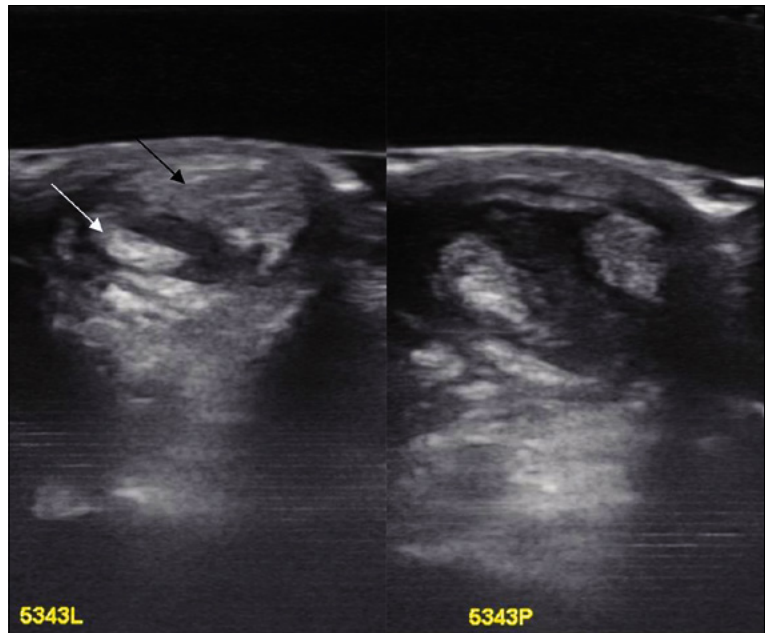
Ryc. 1. Zmiany histologiczne w ścięgnie Achillesa po iniekcji kolagenazy *Clostridium histolyticum* typu 1A – S (C-5894, Sigma Aldrich, Poznań, Polska)

dotkowej ścięgna mięśnia zginacza głębokiego palców obu kończyn piersiowych (średnia masa ciała koni wynosiła 464 kg; 24), 1000 UI kolagenazy rozpuszczonych w 0,1 ml sterylnej wody do iniekcji podane do tego mięśnia obu kończyn piersiowych u pięciu koni (masa ciała koni wyniosła od 350 do 400 kg; 25), 2087 UI kolagenazy rozpuszczonej w 0,3 ml sterylnej wody do iniekcji; objętość 0,3 ml roztworu została podzielona na dwie równe części i następnie wstrzyknięta w postaci dwóch iniekcji w odległości około 2 cm od siebie, 13–15 cm od kości dodatkowej nadgarstka do ścięgna mięśnia zginacza powierzchownego palców wybranej losowo kończyny piersiowej u ośmiu koni (26), 4000 UI kolagenazy podano do ścięgna mięśnia zginacza powierzchownego palców w strefie 2B sześciu koniom, w tym u czterech zastosowano iniekcje do wszystkich kończyn, a u dwóch do trzech kończyn (obie kończyny piersiowe oraz kończyna prawa miedniczna; 14), 2640 UI kolagenazy rozpuszczonej w sterylnej wodzie do iniekcji podano ośmiu koniom w trzy miejsca w centralnej części ścięgna mięśnia zginacza powierzchownego palców (27), 0,4 ml (3000 UI/ml) czyli 1200 UI wstrzyknięto w lateralną gałąź mięśnia międzykostnego koni ważących około 495 kg (28).

Kolagenaza została szeroko opisana w literaturze światowej, gdyż uszkodzenie wywołane jej działaniem pod wieloma względami (przerost komórkami fibroblastów, utrata organizacji macierzy zewnątrzkomórkowej, hiperwaskularyzacja oraz, w późniejszym etapie, brak komórek zapalnych (29, 30, 31, 32, 33, 34; **ryc. 1**) w dużym stopniu przypomina naturalnie występującą tendinopatię (**ryc. 2**). Niestety, użycie kolagenazy do indukcji ogniska tej patologii pozostaje w dużej mierze efektem indywidualnych doświadczeń różnych autorów, a nie standaryzacji metody w oparciu o badania doświadczalne. W opisie produktu można doszukać się podobnej sugestii stosowania roztworu oraz informacji o konieczności zastosowania rozpuszczalników bogatych w jony wapnia, np. Krebs Ringer buffer with calcium. W oparciu o dane literaturowe dotyczące użycia roztworów kolagenazy można wysnuć następujące wnioski:

- 1) nie wszyscy autorzy publikacji naukowych podają dokładną charakterystykę użytego enzymu, a także objętość iniekcji,
- 2) ujednolicone do jednostek UI/ml stężenia przeznaczane do rozpuszczania ścięgien wahają się od 125 UI/ml do 10 000 UI/ml,
- 3) stężenia roztworu podawane są w formie mg/ml, UI/ml lub jako ilość UI wstrzyknięta do lub w okolicy ścięgien,
- 4) nie znaleziono standardów rekomendujących odpowiednią objętość roztworu kolagenazy oraz jego stężenia w stosunku do gatunku zwierzęcia oraz cech określonej tkanki,
- 5) autorzy stosują roztwory bez dodatku jonów wapnia, np. PBS, 0,9% NaCl lub sterylną wodę do iniekcji.

Roztwory powyżej 1000 UI/ml stosowano u szczerów (ścięgno Achillesa) i koni (ścięgno mięśnia zginacza powierzchownego palców) w iniekcjach zarówno doświadczeniowych, jak i okołodoświadczeniowych, mimo



Ryc. 2. Obraz USG ścięgien w rejonie ścięgna Achillesa obu tylnych kończyn u owcy po dwóch tygodniach od indukcji tendinopatii za pomocą iniekcji 100 UI kolagenazy *Clostridium histolyticum* rozpuszczonej w 0,2 ml PBS

oczywistych różnic w wielkościach tkanek poddawanych iniekcjom. Średnia powierzchnia ścięgna mięśnia zginacza powierzchownego palców u koni wynosi około 108 mm² (35), a ścięgna Achillesa u szczura około 0,94 mm² (36). U owiec dotychczas stosowano roztwory o koncentracji 400–500 UI/ml, w iniekcjach doświadczeniowych. W badaniu własnym użyto roztworu 100 UI kolagenazy *Clostridium histolyticum* typu 1A – S (C-5894, Sigma Aldrich) w objętości 0,2 ml sterylnej PBS w iniekcji do ścięgna Achillesa (37). Wybrane stężenie okazało się skuteczną i bezpieczną metodą indukcji tendinopatii (38).

Podsumowując, należy stwierdzić, że użycie kolagenazy do wywołania tendinopatii jest efektywne, a powstałe uszkodzenie klinicznie i obrazowo przypomina naturalnie występujący proces patologiczny (39). W literaturze jest to uznany model indukcji wymienionego procesu do celów badawczych. Niemniej jednak istnieje wiele nieścisłości, zarówno w stosunku do rodzaju użytego enzymu, doboru rozpuszczalnika oraz stężenia roztworu i jego objętości. Jedyne u koni podjęto próbę standaryzacji tej metody.

Piśmiennictwo

1. Yang G., Rothrauff B.B. and Tuan R.S.: Tendon and Ligament Regeneration and Repair: Clinical Relevance and Developmental Paradigm. *Birth Defects Res. C. Embryo Today*. 2013, **99**, 203–222.
2. Sharma P., Maffulli N., Current Concepts Review Tendon Injury and Tendinopathy: Healing and Repair. *J. Bone Joint Surg.* 2005, **87**, 187–202.
3. Lui P.P.Y., Maffulli N., Rolf C., Smith R.K. W.: Review: What are the validated animal models for tendinopathy? *Scand. J. Med. Sci. Sports*. 2011, **21**, 3–17.
4. Barreira A.P.B., Alves A.L.G., Saito M.E., Amorim R.L., Kohayagawa A., Menarim B.C. and Mota L.S., Autologous implant of bone marrow mononuclear cells as treatment of induced equine tendinitis. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* 2008, **6**, 46–54.
5. Nixon A.J., Dahlgren L.A., Haupt J.L., Yeager A.E. and Ward D.L.: Effect of adiposederived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am. J. Vet. Res.* 2008, **69**, 928–937.

6. Kalisiak O.: Zachowawcze leczenie ścięgien u koni. *Życie Wet.* 2008, **83**, 132–135.
7. Dirks R.C., Warden S.J.: Models for the study of tendinopathy. *J. Musculoskelet. Neuron. Interact.* 2011, **11**, 141–149.
8. Lui P.P., Fu S., Chan, Hung L., and Chan K.: Chondrocyte Phenotype and Ectopic Ossification in Collagenase-induced Tendon Degeneration. *J. Histochem. Cytochem.* 2009, **57**, 91–100.
9. Tsai Y., Chang C., Lee J., Liang J., Hsieh T., Yeh M., and Sze C.: Direct Radiofrequency Application Improves Pain and Gait in Collagenase-Induced Acute Achilles Tendon Injury. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2013, Article ID 402692, doi:10.1155/2013/402692.
10. Leão Casalechi H., Pinto Leal-Junior E.C., Xavier M., Silva Jr. J.A., de Tarso Camillo de Carvalho P., Aimbire F., Albertini R.: Low-level laser therapy in experimental model of collagenase-induced tendinitis in rats: effects in acute and chronic inflammatory phases. *Lasers Med. Sci.* 2013, **28**, 989–995.
11. Chen Y., Wang C., Yang K.D., Kuo Y., Huang H., Huang Y., Sun Y., Wang F.: Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGF- β 1 and IGF-I expression. *J. Orth. Res.* 2004, **22**, 857–861.
12. Yamamoto E., Hata D., Kobayashi A., Ueda H., Tangkawattana P., Oikawa M., Takehana K.: Effect of Beta-aminopropionitrile and Hyaluronic Acid on Repair of Collagenase-induced Injury of the Rabbit Achilles Tendon. *J. Comp. Pathol.*, 2002, **126**, 161–70.
13. Martinello T., Bronzini I., Perazzi A., Testoni S., De Benedictis G.M., Negro A., Caporale G., Mascarello F., Iacopetti I., Patruno M.: Effects of In Vivo Applications of Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells (PB-MSCs) and Platelet-Rich Plasma (PRP) on Experimentally Injured Deep Digital Flexor Tendons of Sheep. *J. Orthop. Res.* 2013, **31**, 306–314.
14. Crovace A., Lacitignola L., Rossi G., Francioso E.: Histological and Immunohistochemical Evaluation of Autologous Cultured Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Bone Marrow Mononucleated Cells in Collagenase-Induced Tendinitis of Equine Superficial Digital Flexor Tendon. *Vet. Med. Int.*, Article ID 250978, doi:10.4061/2010/250978.
15. Lacitignola L., Staffieri F., Rossi G., Francioso E., Crovace A.: Survival of bone marrow mesenchymal stem cells labelled with red fluorescent protein in an ovine model of collagenase-induced tendinitis. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 2014, **3**, 204–209.
16. Williams I.F., McCullagh K.G., Goodship A.E., Silver I.A.: Studies on the pathogenesis of equine tendonitis following collagenase injury. *Res. Vet. Sci.* 1984, **36**, 326–38.
17. Miluzzi Yamada A.L., Garcia Alves A.L., Hussni C.A., de Mello Nicoletti J.L., Thomassian A., Watanabe M.J., Carneiro R., Comparison of different doses of collagenase-induced equine tendonitis: clinical and ultrasonographic study. *Cienc. Rural* 2009, **39**, 1124–1130.
18. Foland J.W., Trotter G.W., Powers B.E., Wrigley R.H., Smith F.W.: Effect of sodium hyaluronate in collagenase-induced superficial digital flexor tendinitis in horses. *Am. J. Vet. Res.* 1992, **53**, 2371–2376.
19. Gaughan E.M., Gift L.J., De Bowes R.M., Basaraba R.M. & Roush J.: The influence of sequential intratendinous sodium hyaluronate on tendon healing in horses. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 1995, **8**, 40–45.
20. Gaughan E.M., Nixon A.J., Krook L.P., Yeager A.E., Mann K.A., Mohammed H. & Bartel D.L.: Effects of sodium hyaluronate on tendon healing and adhesion formation in horses. *Am. J. Vet. Res.* 1991, **52**, 764–773.
21. Lacerda Neto de J.L., de Freitas J.M.R., Poggiani F.M., Dias D.P.M., Gravena K., Bernardi N.S., Ribeiro G., Borges V.P., Serial superficial digital flexor tendon biopsies for diagnosing and monitoring collagenase-induced tendonitis in horses. *Pesq. Vet. Bras.* 2013, **33**, 710–718.
22. Maia L., Souza M.V., Ribeiro-Júnior J.I., Oliveira A.C., Alves G.E.S., Benjamin L.A., Silva Y.F.R.S., Zandim B.M., Moreira J.C.L.: Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation. *J. Equine Vet. Sci.* 2009, **29**, 618–626.
23. Marxen S., Lacerda-Neto J.C., Canola J.C., Moraes J.R.E., Ribeiro G.: Intralesional polysulphated glycosaminoglycan as treatment of equine collagenase induced tendinitis: clinical, ultrasonographic and histopathologic evaluation. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2004, **56**, 701–708.
24. Waguespack R.W., Burba D.J., Hubert J.D., Vidal M.A., Lomax L.G., Chirgwin S.R., Lopez M.J.: Effects of Extracorporeal Shock Wave Therapy on Desmitis of the Accessory Ligament of the Deep Digital Flexor Tendon in the Horse. *Vet. Surg.* 2011, **40**, 450–6.
25. Dehghan M.M., Mehrjerdi H.K., Masoudifard M., Baghban Eslami-nejad M.R., Sharifi D., Vajhi A.R.: Clinical and Ultrasonographic Findings of Collagenase Induced Tendinitis in the Horse. *IJVS* 2007, **2**, 47–58.
26. Alan J. Nixon, MS; Linda A. Dahlgren, Jennifer L. Haupt, Amy E. Yeager, Daniel L. Ward.: Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am. J. Vet. Res.* 2008, **69**, 928–937.
27. Dahlgren L.A., van der Meulen M.C.H., Bertram J.E.A., Starrak G.S., Nixon A.J.: Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *J. Orth. Res.* 2002, **20**, 910–919.
28. Keg P.R., Schamhardt H.C., van Weeren P.R.: The effect of the high palmar nerve block and the ulnar nerve block on lameness provoked by a collagenase-induced tendinitis of the lateral branch of the suspensory ligament. *Vet. Q.* 1996, **18**, 103–105.
29. Fu S.C., Chan B.P., Wang W., Pau H.M., Chan K.M., Rolf C.G.: Increased expression of matrix metalloproteinase 1 (MMP1) in 11 patients with patellar tendinosis. *Acta Orthop. Scand.* 2002, **73**, 658–62.
30. Fu S.C., Chan K.M., Rolf C.G.: Increased deposition of sulfated glycosaminoglycans in human patellar tendinopathy. *Clin. J. Sport. Med.* 2007, **17**, 129–34.
31. Fu S.C., Wang W., Pau H.M., Wong Y.P., Chan K.M., Rolf C.G.: Increased expression of transforming growth factor- β 1 in patellar tendinosis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2002, **400**, 174–83.
32. Jarvinen M., Jozsa L., Kannus P., Jarvinen T.L., Kvist M., Leadbetter W.: Histopathological findings in chronic tendon disorders. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 1997, **7**, 86–95.
33. Khan K.M., Cook J.L., Bonar F., Harcourt P., Astrom M.: Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. *Sports Med.* 1999, **27**, 393–408.
34. Riley G.: Chronic tendon pathology: molecular basis and therapeutic implications. *Expert Rev. Mol. Med.* 2005, **7**, 1–25.
35. Avella, Ely E.R., Verheyen K.L., Price J.S., Wood J.L., Smith R.K.: Ultrasonographic assessment of the superficial digital flexor tendons of National Hunt racehorses in training over two racing seasons. *Equine Vet. J.* 2009, **41**, 449–454.
36. Legerlotz K., Schjerling P., Langberg H., Brüggemann G., Niehoff A.: The effect of running, strength, and vibration strength training on the mechanical, morphological, and biochemical properties of the Achilles tendon in rats. *J. Appl. Physiol.* 2007, **102**, 564–572.
37. Facon-Poroszewska M., Kielbowicz Z., Prządka P.: Influence of Radial Pressure Wave Therapy (RPWT) on collagenase-induced Achilles tendinopathy treated with Platelet Rich Plasma and Autologous Adipose Derived Stem Cells. *Pol. J. Vet. Sci.* 2019, **22**, 743–751.
38. Facon-Poroszewska M., Kielbowicz Z., Prządka P.: Systemic inflammatory response to the Radial Pressure Wave Therapy (RPWT) in collagenase-induced Achilles tendinopathy treated with Adipose Derived Stem Cells or Platelet Rich Plasma. *Pol. J. Vet. Sci.* 2019, **22**, 735–742.
39. Crovace A., Lacitignola L., Francioso E., Rossi G.: Histology and immunohistochemistry study of ovine tendon grafted with cBMSCs and BMMNCs after collagenase-induced tendinitis. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 2008, **4**, 329–336.

Dr Marta Facon-Poroszewska,
e-mail: marta.facon-poroszewska@upwr.edu.pl