

УДК616.717/.714-001-085.361:611.013]-097-092.9

ПОРУШЕННЯ ЦИТОКІНОВОГО ПРОФІЛЮ У ДИНАМІЦІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ КРАНІО-СКЕЛЕТНОЇ ТРАВМИ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЯ ФЕТАЛЬНИМИ НЕРВОВИМИ КЛІТИНАМИ

Борис Р.М.

Український НДІ медицини транспорту, м. Одеса

За умов експериментальної краніо-скелетної травми відмічається виражений дисбаланс цитокінів, що супроводжується збільшенням вмісту IL-2 й IL-6 у сироватці крові, які досягають максимуму через 14 діб з наступним їх зниженням, коливальними відхиленнями TNF-± та стабільно високим вмістом IL-10 через 7-25 діб експерименту. Введення суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин потенціує про- і протизапальні механізми, які забезпечуються підвищенням вмістом досліджуваних цитокінів впродовж 25 діб експерименту з коливанням вмісту TNF-± та IL-10 в сироватці крові у протифазах стосовно некорегованих тварин, що забезпечує баланс запальної реакції.

Ключові слова: краніо-скелетна травма, експеримент, цитокіни, кріоконсервовані фетальні нервові клітини.

Вступ

Кожен день у світі помирає 16 000 людей у результаті травми, що становить 5,8 млн на рік [12]. Згідно прогнозів окремих автоів до 2020 р. очікується зростання летальності до 8,4 млн на рік [13]. Важливим моментом є те, що найвищий травматизм спостерігається в країнах, що розвиваються у зв'язку зі збільшенням кількості транспорту, проте і у розвинених країнах травма залишається найбільш поширеною причиною смерті та інвалідності серед дітей і підлітків [11].

Незадовільним залишається і лікування травматичних ушкоджень, що пов'язано зі збільшенням числа тяжких травм, надмірним акцентування уваги на технічну сторону лікування переломів та не врахуванням загальних закономірностей розвитку реакції організму на тяжку травму [5]. Тому пошук нових, патогенетично обґрунтованих методів терапії травматичної хвороби є актуальною медичною і соціальною проблемою.

Серед засобів системної корекції останнім часом увага дослідників зосереджується на терапії фетальними нервовими клітинами. Їх терапевтичний потенціал зумовлений ангіогенним, антиапоптотичним, антиоксидантним і мітогенним

ефектами [1, 8]. Існує припущення, що механізми відновлення зумовлені не диференціюванням клітин, а звільненням трофічних факторів, які стимулюють ендогенні механізми репарації, знижують клітинну загибель і стимулюють ангіо- і нейрогенез, що підтверджується експериментально [7]. Фетальній тканині, крім цього, притаманна експресія цитокінів, що зумовлює її протипухлинний вплив [6]. Однак саме надмірне утворення і викид в системний кровотоку прозапальних цитокінів (TNF-±, IL-1, IL-6, IL-8) є причиною розвитку системної відповіді організму на запалення, що веде до поліорганної недостатності, яка вважається однією з основних причин смерті при тяжкій травмі [3].

Тому дослідження динаміки цитокінів в умовах краніо-скелетної травми та при введенні фетальних нервових клітин становить значний інтерес.

Мета роботи: з'ясувати вплив суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин щура на концентрацію цитокінів в динаміці експериментальної краніо-скелетної травми.

Матеріали і методи

В експериментах використано 104 нелінійних білих щури-саці масою 180-200

г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин розділили на три групи: контрольну і дві дослідні. У контрольну групу увійшли 8 інтактних тварин. В обох дослідних групах – по 48 тварин під тіопентало-натрієвим наркозом ($40 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ маси тіла) моделювали закриту черепно-мозкову травму за методикою [4] у власній модифікації. Енергія удару становила $0,375 \text{ Дж}$, що відповідало травмі середнього ступеня тяжкості. Крім цього, спеціально розробленим пристроєм наносили однократний удар по кожному стегну, що викликало закритий перелом стегнових кісток.

Через 12 год після травмування в одній із дослідних груп внутрішньочеревно вводили суспензію кріоконсервованих фетальних нервових клітин щура в дозі $5 \cdot 10^6$ клітин на 100 г маси тварини [2]. Суспензію фетальних нервових клітин виготовляли в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків) шляхом ошадної механічної дисоціації фрагментів мозку ембріонів щурів 11-ти діб гестації і кріоконсервування на програмному заморозувачі УОП-6. Відігрівання зразків проводили на водяній бані при температурі $37 \text{ }^\circ\text{C}$. В іншій дослідній групі внутрішньочеревно вводили еквівалентний об'єм фізіологічного розчину.

У тварин, які вижили, у сироватці крові визначали концентрацію фактора некрозу пухлин- \pm (TNF- \pm), інтерлейкінів 2 (IL-2), 6 (IL-6) і 10 (IL-10) імуноферментним методом з використанням аналізатора Stat Fax (USA).

Достовірність відмінностей між дослідними і контрольною групою оцінювали з використанням прикладного пакету Stat Soft Statistica 10.

Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувались міжнародних вимог про гуманне поводження з тваринами відповідно до правил "Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою" (European

Convention, 1984); методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України про "Доклінічні дослідження лікарських засобів" (2001). Евтаназію щурів в усіх експериментах проводили шляхом тотального кровопускання з серця після попереднього тіопентало-натрієвого наркозу ($60 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ маси тіла тварини внутрішньочеревно).

Результати досліджень та їх обговорення

Із таблиці 1 видно, що за умови експериментальної краніо-скелетної травми концентрація IL-2 через 3 доби була вища на $14,9 \%$, через 7 діб – на $12,8 \%$ і через 14 – на $24,7 \%$ стосовно показників контролю ($p < 0,10-0,01$). Відмічено, що через 25 діб досліді концентрація IL-2 зменшувалась до рівня контрольних значень. Порівнюючи дослідні групи між собою, було встановлено, що через 14 діб експерименту вміст IL-2 був максимальний і перевищував дані через 7 діб на $13,9 \%$ ($p < 0,10$) (табл. 1, рис. 1).

Введення суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин щурам із модельованою краніо-скелетною травмою практично не зумовлювало змін концентрації IL-2 у дослідних групах порівняно з отриманими даними без корекції. Потрібно зазначити, що цифрові величини протягом всього експерименту за умови клітинної терапії статистично значимо відрізнялись від показника контролю (табл. 1, рис. 1).

Аналіз динаміки вмісту IL-6 показав (табл. 1), що у відповідь на травму порівняно із контрольною групою суттєво збільшувалася його концентрація через 7 діб в $1,9$ раза, через 14 діб – у $2,1$ раза. Через 25 год модельованої краніо-скелетної травми даний показник зменшувався на $41,5 \%$ відносно результатів попередньої дослідної групи, проте залишався статистично вищим контролю (в $1,5$ раза, $p < 0,001$).

Концентрація IL-6 під впливом краніо-скелетної травми при застосуванні клітинної терапії зростала через 3 доби на $11,1 \%$, тоді як вже через 7 діб зменшу-

Таблиця 1

Динаміка вмісту цитокінів у сироватці крові у відповідь на краніо-скелетну травму, кореговану клітинною терапією (M ± m)

Умови експерименту	3 доба	7 доба	14 доба	25 доба
IL-2, пг·мл ⁻¹ Контроль = (10,10 ± 0,30) ум.од. (n = 8)				
Без корекції	11,65 ± 0,36** (n = 7)	11,10 ± 0,42# (n = 6)	12,64 ± 0,55** (n = 7)	10,26 ± 0,60 (n = 8)
	11,63 ± 0,22** (n = 8)	11,89 ± 0,26*** (n = 8)	12,35 ± 0,39*** (n = 10)	11,30 ± 0,39* (n = 9)
р	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
IL-6, пг·мл ⁻¹ Контроль = (20,08 ± 1,05) г·л ⁻¹ (n = 8)				
Без корекції	20,90 ± 0,93 (n = 7)	38,55 ± 1,38*** (n = 6)	43,01 ± 1,07*** (n = 7)	29,64 ± 1,12*** (n = 8)
	23,13 ± 0,69* (n = 8)	28,26 ± 1,40*** (n = 8)	43,81 ± 4,10*** (n = 10)	35,56 ± 1,22*** (n = 9)
р	< 0,10	< 0,001	> 0,05	< 0,01
TNF-?				
Контроль = (72,58 ± 4,09) пг·мл ⁻¹ (n = 8)				
Без корекції	69,76 ± 2,50 (n = 7)	82,65 ± 2,07* (n = 6)	53,09 ± 1,47*** (n = 7)	77,86 ± 3,27 (n = 8)
	83,00 ± 1,76* (n = 8)	77,58 ± 2,68 (n = 8)	96,85 ± 2,78*** (n = 10)	86,00 ± 2,06* (n = 9)
р	< 0,001	> 0,05	< 0,001	< 0,10
IL-10, пг·мл ⁻¹ Контроль = (71,58 ± 4,09) г·л ⁻¹ (n = 8)				
Без корекції	77,26 ± 3,27 (n = 7)	129,4 ± 2,4*** (n = 6)	100,2 ± 1,5*** (n = 7)	118,9 ± 3,0*** (n = 8)
	113,0 ± 2,5*** (n = 8)	111,6 ± 6,1*** (n = 8)	129,8 ± 2,8*** (n = 10)	118,0 ± 3,9*** (n = 9)
р	< 0,001	< 0,05	< 0,001	> 0,05

Примітки: 1. *# – достовірність відмінностей стосовно контрольної групи (* – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001; # – p < 0,10).

2. р – достовірність відмінностей стосовно між групами корегованих і не корегованих тварин.

валася в 1,4 раза порівняно з групою без корекції. Через 14 діб модельованої травми при введенні суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин концентрація IL-6 практично не відрізнялась від даних групи порівняння, у той час як через 25 діб відмічено зменшення рівня даного показника в 1,2 раза стосовно попередньої дослідної групи. Потрібно зазначити, що концентрація IL-6 через 25 діб залишалася значно вищою відносно контролю (в 1,8 раза, p < 0,001) і даних групи порівняння без корекції (в 1,2 раза, p < 0,05) (табл. 1, рис. 2).

Корекція суспензією кріоконсервованих фетальних нервових клітин щуром із модельованою краніо-скелетною травмою була малоефективною щодо нормалізації вмісту IL-2.

У свою чергу концентрація TNF-± мала коливальний характер. Так, при експериментальній краніо-скелетній травмі порівняно з контролем концентрація TNF-± через 7 діб була вища на 13,4 %, а вже через 14 діб зменшилася на 27,2 %, тоді як через 25 діб його рівень практично повертався до норми (табл. 1, рис. 3).

Отримані дані свідчать про те, що за умов краніо-скелетної травми на фоні значної антигенемії і виснаження адаптаційних реакцій організму на стрес відбувається активація прозапальних цитокінів у перші 14 діб зазначеної патології. У подальшому при поєднаній травмі розвивається транзиторна клітинна і гуморальна імуносупресія, нейрогенна дисфункція [9], на фоні яких зменшується також продукція IL-2 й IL-6. По напрямку дії IL-6 децю відрізняється від інших прозапальних цитокінів, формуючи фенотип макрофага у затухаючому вогнищі запалення [14], тому підвищення вмісту його у сироватці крові відмічається на 7 добу з максимумом – через 14 діб.

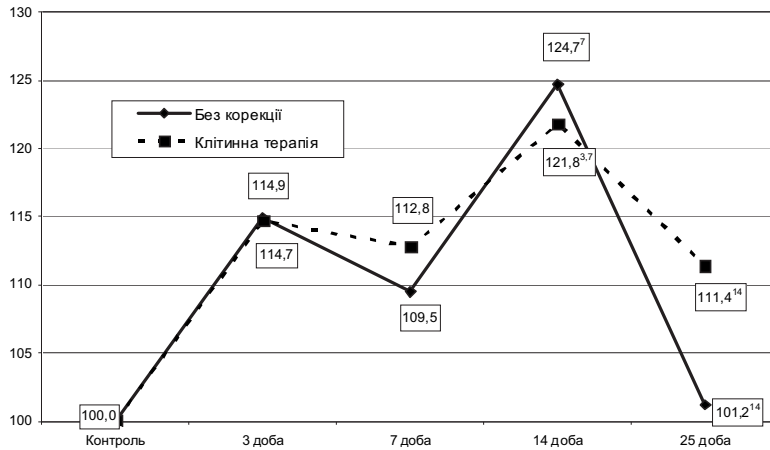


Рис. 1. Динаміка відхилень вмісту IL-2 сироватки крові (у відсотках від рівня контролю) у тварин з краніоскелетною травмою під впливом клітинної терапії

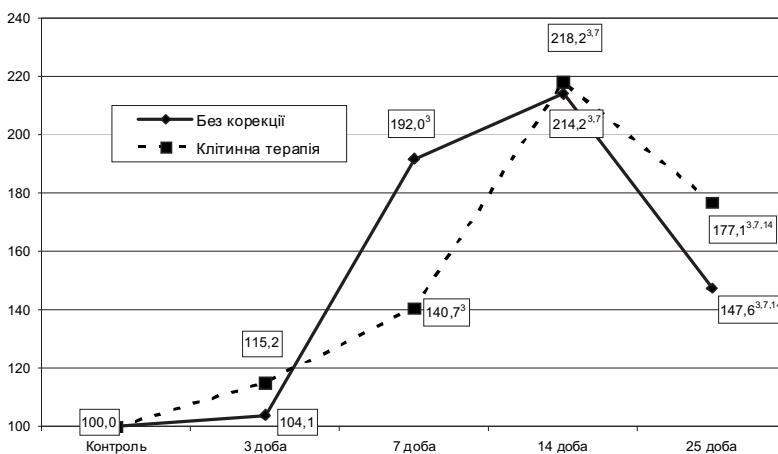


Рис. 2. Динаміка відхилень вмісту IL-6 сироватки крові (у відсотках від рівня контролю) у тварин з краніоскелетною травмою під впливом клітинної терапії

Цікавим є те, що на фоні максимального зростання через 14 діб IL-2 й IL-6 концентрація TNF- \pm була максимально низькою серед усіх дослідних груп. Це можна пояснити тим, що TNF- \pm є цитокіном «першої хвили», який синтезується у відповідь на антигенну стимуляцію й індукує біосинтез центрального регуляторного IL-2, який, у свою чергу, впливає на продукцію TNF- \pm [10].

Введення суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин щурам на фоні модельованої травми зумовлювало протилежні зміни концентрації TNF- \pm стосовно даних дослідних груп без корекції. Так, через 3 доби даний показник зріс в 1,2 раза, тоді як через 7 діб – зменшився

практично до контрольних значень з наступним підйомом, який був більший через 14 діб в 1,8 раза і через 25 діб – в 1,1 раза стосовно отриманих результатів до проведення клітинної терапії. Потрібно відмітити, що концентрація TNF- \pm через 3, 14 і 25 діб була статистично вища показників контролю (табл. 1, рис. 3).

Аналіз динаміки вмісту протизапального IL-10 показав (табл. 1), що у відповідь на травму порівняно із контрольною групою суттєво збільшувалася його концентрація через 7 діб (на 80,9 %, $p < 0,001$) з наступним зниженням через 14 діб на 40,8 % стосовно попередньої групи і поступовим зростанням до кінця 25 доби, коли його вміст на

66,2 % був вищий контролю ($p < 0,001$) і на 26,1 % – отриманих даних через 14 діб ($p < 0,01$).

Введення суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин щурам на фоні модельованої травми зумовлювало прямо протилежні зміни IL-10 протягом 14 діб експерименту. Так, через 3 доби даний показник зріс в 1,5 раза, зберігаючи стабільну концентрацію до кінця 7-ої доби з наступним зростанням через 14 діб в 1,3 раза стосовно дослідної групи без корекції. Через 25 діб різниця у концентрації IL-10 у групах тварин без корекції і з проведеною клітинною терапією нівелювалась й отримані показники практично не відрізнялись між собою, проте

були значно вищі контролю ($p < 0,01$).

Отримані дані свідчать про те, що на фоні модельованої травми відбувається максимальне компенсаторне напруження протизапальних резервів через 7 діб експерименту з наступним зростанням через 25 діб. Введення суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин тваринам на фоні травми зумовлює напруження протизапальних механізмів вже через 3 доби і найвище зростання концентрації IL-10 через 14 діб, коли відбувається найбільш виражена прозапальна дія цитокінів. Це свідчить про виражений протизапальний механізм суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин.

Можна припустити, що збільшення утворення про- і протизапальних цитокінів на тлі краніо-скелетної травми, яке виникає у протифазі стосовно їх утворення у травмованих тварин без клітинної терапії, забезпечує стабільно високий їх рівень, що має важливе значення для попередження компенсаторного синдрому антизапальної відповіді, який зумовлює зниження імунологічної відповіді на збудники нозокоміальних інфекцій [3].

Висновки

1. З урахування умов експериментальної краніо-скелетної травми відмічається виражений дисбаланс цитокінів, що супроводжується збільшенням вмісту IL-

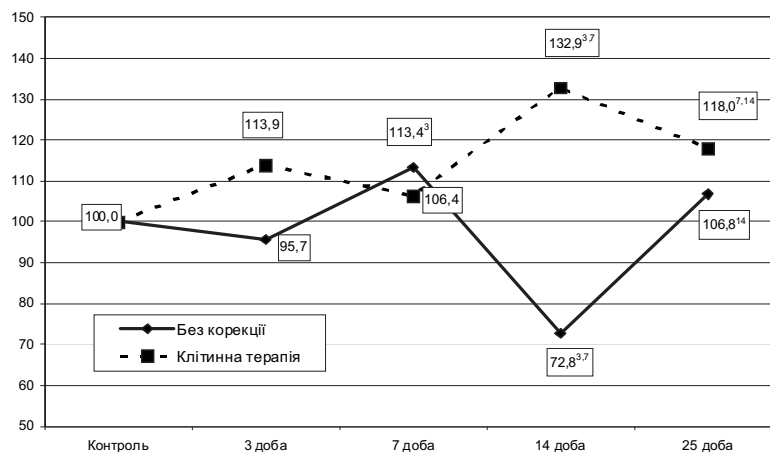


Рис. 3. Динаміка відхилень вмісту фактор TNF- α сироватки крові (у відсотках від рівня контролю) у тварин з краніо-скелетною травмою під впливом клітинної терапії

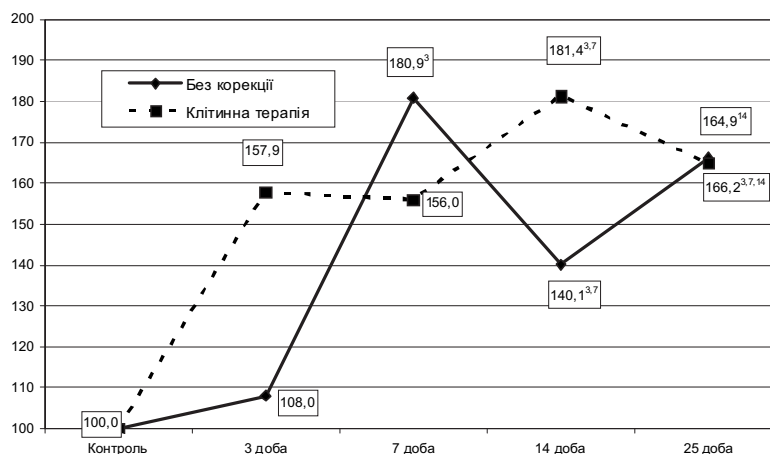


Рис. 4. Динаміка відхилень вмісту IL-10 сироватки крові (у відсотках від рівня контролю) у тварин з краніо-скелетною травмою під впливом клітинної терапії

2 й IL-6 у сироватці крові, які досягають максимуму через 14 діб з наступним їх зниженням, та коливальними відхиленнями TNF- \pm , який збільшується через 7 діб, досягає мінімальної величини – через 14 діб і нормалізується – через 25 діб. Встановлено максимальне компенсаторне напруження протизапальних резервів (IL-10) через 7-25 діб експерименту із коливанням в бік зниження через 14 діб.

2. Введення суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин потенціює про- і протизапальні механізми, які забезпечуються підвищеним

вмістом досліджуваних цитокінів впродовж 25 діб експерименту. Вміст у сироватці крові TNF- \pm та IL-10 коливається у протифазах стосовно некорогованих тварин, та забезпечує баланс запальної реакції.

Перспективи подальших досліджень

У перспективі передбачається поглибити вивчення механізмів розвитку системної запальної відповіді в умовах краніо-скелетної травми та при клітинній терапії з метою розробки нових методів системної корекції.

Література

1. Борис Р.М., Кухарчук О.Л. Вплив трансплантації ембріональних прогеніторних клітин на функціональний стан нирок у щурів з колоногенним перитонітом // експериментальна і клінічна медицина. – 2010. – № 3 (48). – С. 25-31.
2. Гольцев А. Н. Апоптотические процессы в тимусе и головном мозге при развитии экспериментального аллергического энцефаломиелита до и после лечения фетальными нервными клетками / А. Н. Гольцев, Е. А. Порожан, Н. Н. Бабенко, М. В. Останков // Патология. – 2001. – Т. 8, № 2. – С. 69-72.
3. Дзюба Д. А. Показатели активации апоптоза в течении политравмы тяжелой степени / Д. А. Дзюба, И. Р. Малыш, Л. В. Згржебловская // Український журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можаєва. – 2008. – Т. 9, № 3. – С. 53-58.
4. Ельский В. Н. Моделирование черепно-мозговой травмы / В. Н. Ельский, С. В. Зяблицев – Донецк: Изд-во “Новый мир”, 2008. – 140 с.
5. Климовицкий В. Г. Травматическая болезнь с позиций современных представлений о системном ответе на травму / В. Г. Климовицкий, О. Г. Калинин // Травма. – 2003. – Т. 4, № 2. – С. 123-130.
6. Семенова В.М. Дослідження протипушлінної дії супернатанту прогеніторних нейроклітин щура на клітини гліом в умовах культивування / В.М. Семенова, Л.Д. Любич, М.І. Лісяний та ін. // Український нейрохірургічний журнал. – 2008. – №4. – С. 63-67.
7. Сергиенко Н.М., Пасечникова Н.В., Варивончик Д.В. Трансплантация эмбриональной сетчатки в субретинальное пространство // Офтальмол. журнал. – 1998. – №3. – С. 241–246.
8. Сукач А.Н. Влияние фетальных нервных клеток на восстановление подвижности конечностей крыс с травматическим повреждением спинного мозга / А.Н. Сукач, А.С. Лебединский, О.В. Оченашко, А.Ю. Петренко / Медицина сьогодні і завтра. – 2011. № 1-2. – С. 50-51.
9. Политравма: травматическая болезнь, дисфункция иммунной системы, современная стратегия лечения / Под ред. Е. К. Гуманенко, В. К. Козлова. – М. : ГОЭТАО-Медиа, 2008. – С. 204-241.
10. Роль интерлейкина-8, дефензинов, фактора некроза опухоли и его рецепторов в процессе реализации воспалительной реакции / Л. В. Кирковский, С. Т. Акалович, Ю. В. Чалый [и др.] // [Электронный ресурс] — http://www.bsmu.by/index.php?option=com_content&task=view&id=478&Itemid=52
11. Bartolomeo S. Di. The regional study-group on major injury. Epidemiology of major injury in the population of Friuli Venezia Giulia – Italy / S. Di Bartolomeo, G. Sanson, V. Michelutto [et al.] // Injury, Int. J. Care Injured. – 2004. – Vol. 35. – P. 391-400.
12. Krug E. G. The Global Burden of Injuries / E G Krug, G K Sharma, R. Lozano // Am. J. Public Health. – 2000. – Vol. 90. – P. 523–526.
13. Murray C L. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020 / C. L. Murray, A. D. Lopez // Lancet. – 1997. – Vol. 349. – P. 1498-1504.
14. Toft P. The systematic inflammatory response after major trauma / P. Toft, S. K. Andersen, E. K. Tonnesen // Ugeskr. Laeger. – 2003. – Vol. 10. – № 165 (7). – P. 669-672.

Резюме

НАРУШЕНИЕ ЦИТОКИНОВОГО
ПРОФИЛЯ В ДИНАМИКЕ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КРАНИО-
СКЕЛЕТНОЙ ТРАВМЫ И ЕГО
КОРРЕКЦИЯ ФЕТАЛЬНЫМИ
НЕРВНЫМИ КЛЕТКАМИ

Борис Р. Н.

При экспериментальной кранио-скелетной травме отмечается выраженный дисбаланс цитокинов, сопровождающийся увеличением содержания IL-2 и IL-6 в сыворотке крови, которые достигают максимума через 14 суток с последующим их снижением, колебательными отклонениями TNF- \pm и стабильно высоким содержанием IL-10 через 7-25 суток эксперимента. Введение суспензии криоконсервированных фетальных нервных клеток потенцирует про- и противовоспалительные механизмы, обеспечивая повышенное содержание исследуемых цитокинов в течение 25 суток эксперимента с колебанием содержания TNF- \pm и IL-10 в сыворотке крови в противофазе относительно некорректированных животных, что обеспечивает баланс воспалительной реакции.

Ключевые слова: кранио-скелетная травма, эксперимент, цитокины, криоконсервированные фетальные нервные клетки.

УДК 617.215.34: 547

**ПЕРСПЕКТИВИ ВІДНОВЛЕННЯ КОМПЕНСАТОРНО-
АДАПТАЦІЙНИХ МЕХАНІЗМІВ ПРИ ГОСТРОМУ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ПЕРИТОНІТІ ЗАСТОСУВАННЯМ
ЕНДОГЕННИХ ПЕПТИДІВ**

Демидов В.М., Демидов С.М.

Одеський національний медичний університет

В експерименті за умов гострого перитоніту в щурів визначали ефективність впливу даларгіну та дельтарану на порушення процесів вільнорадикального окислення ліпідів. Показано, що перебіг гострого експериментального перитоніту супроводжується активацією процесів ліпопероксидації та пригніченням активності антиоксидантної системи. Виражену антиоксидантну дію за модельних умов, яка тривала впродовж 9 діб, спричиняють пептиди даларгін та дельтаран. За умов їхнього сумісного введення антиоксидантні ефекти цієї схеми корекції компенсаторно-адаптаційних механізмів суттєво підсилюються.

Ключові слова: перекисне окислення ліпідів, антиоксидантна система, гострий перитоніт, даларгін, дельтаран, компенсаторно-адаптаційні механізми

Summary

THE VIOLATIONS OF CYTOKINE PROFILE
IN THE DYNAMICS OF EXPERIMENTAL
CRANIO-SKELETAL INJURY AND ITS
CORRECTION BY FETAL NERVE CELLS

Boris R.M.

It is observed a pronounced cytokines' imbalance, accompanied by an increasing the contents of IL-2 and IL-6 in serum, which reach to a maximum after 14 days, followed by a decreasing, oscillatory deviations of TNF- \pm and consistently high IL-10 through 7-25 days the experiment under the conditions of experimental cranio-skeletal injury. The injection of cryopreserved fetal nerve cells suspension potentiates pro- and anti-inflammatory mechanisms that ensured a high content of investigated cytokines within 25 days of experiment with fluctuations of TNF- \pm and IL-10 content in serum in antiphase relative to untreated animals, which provides a balance of inflammatory response.

Keywords: cranio-skeletal injury, experiment, cytokines, cryopreserved fetal nerve cells.

*Вперше поступила в редакцію 03.05.2013 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*