

УДК 616.15-002-006.3:611.018.1:599.323.4

С. П. Ярова, А. Г. Попандопуло, А. П. Брашкін

ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР ДЛЯ КОРЕКЦІЇ ЗАПАЛЬНО-ДЕСТРУКТИВНОГО ПРОЦЕСУ ЩЕЛЕПНОЇ КІСТКИ

Донецький національний медичний університет ім. Максима Горького
ДУ «Інститут невідкладної і відновної хірургії ім. В. К. Гусака»

Хронічна осередкова інфекція в навколорубних тканинах і її вплив на організм — важлива й до кінця не вивчена проблема стоматології [1-3]. Сучасні дослідження, до мети яких входить підвищення ефективності комплексного лікування пацієнтів із запально-деструктивними процесами (ЗДП) альвеолярного відростка, ведуться з урахуванням особливостей розвитку й перебігу пародонтиту, сучасних методів і засобів лікування; етіопатогенетичної концепції біоактивного впливу на деструктивне вогнище й організм у цілому. Одним з основних компонентів патогенетичного лікування є вплив на місцеві та системні регуляційні фактори резорбції кісткової тканини і стимулювання процесів репаративної регенерації тканин пародонта [4].

Останнім часом у літературі все частіше стали використовувати термін «регенеративна медицина». Підстава для цього — досягнення сучасної біології і медицини у вивченні стовбурових клітин (СК), які надають широкі можливості для розвитку трансплантації клітин і тканин при різних патологічних процесах [5-7]. Але, незважаючи на значні досягнення експериментальної і клінічної медицини у вивченні стовбурових клітин, залишається невирішеною низка питань, зокрема, клінічного патогенетично обґрунтованого їх використання при запально-деструктивних процесах кісткової тканини [8].

Мета дослідження - вивчити зміни цитокинового профілю (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10) сироватки крові щурів із модельованим рановим процесом щелепної кістки під дією клітинного субстрату (культури МСК) і його продуцентів (супернатанту) для визначення патофізіологічного механізму їх участі в процесі запалення і регенерації кістки при запально-деструктивному процесі.

Дослідна робота є фрагментом планової науково-дослідної роботи лабораторії клітинного і тканинного культивування ДУ «Інститут невідкладної і відновної хірургії» ім. В. К. Гусака НАМН України за темою «Розробка клітинно-тканинних технологій для лікування потерпілих із переломами кісток кінцівок» (№ ГР 0107U000282).

Об'єкт і методи дослідження

Об'єктом дослідження став запально-деструктивний процес, що моделювався в кістковій рані щелепної кістки в експериментальних

тварин на тлі генералізованого пародонтиту, в якому вивчали і біохімічні властивості загоєння кісткової тканини: активність факторів, що регулюють виразність та характер фазного запального процесу (цитокіни (ЦК) - TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10).

Робота була виконана на 195 нелінійних білих статевозрілих щурах-самцях породи Wistar масою 270 \pm 58 грам і віком 11-12 місяців, зі спонтанним пародонтитом, що визначався на підставі клінічного стану зубощелепної системи.

Групу контролю склали 15 тварин, яким після нанесення експериментальної моделі ранового процесу в стандартних умовах рану вшивали без закладки матеріалу. У групу I увійшли щури (60 тварин), яким в експериментальну рану був підсаджений остеопластичний матеріал, традиційно застосовуваний у клінічній практиці та відібраний нами як носій на попередньому етапі дослідження. Перед внесенням їх у рану для їх активації матеріали змочували в 0,9% розчині хлориду натрію до повного насичення. Групу II склали тварини (60 тварин), у рану яким підсаджували остеопластичний матеріал, індукований кондиціонованим культуральним середовищем (ККС) - супернатантом, отриманим при культивуванні МСК. У групу III увійшли тварини (60 тварин), у рану яким підсаджували МСК після культивування на остеопластичному матеріалі, відібраному як носій. Кожна група (за винятком групи контролю) складалася з підгруп залежно від остеопластика, що використовували: підгрупи «А» — «Колалан-Л» (групи порівняння IA, IIA і IIIA) і підгрупи «В» - «Hypro-sorb F» (групи порівняння IB, IIB і IIIB).

Остеопластичні матеріали «Колалан-Л» і «Hypro-sorb F» нами були обрані за результатами скринінгового дослідження (методика щодо відбору матеріалу і його результати наведені нами в попередніх публікаціях) [9-11].

Оперативне втручання виконували в умовах загального знеболювання шляхом інтраперитонеального введення каліпсолю і ксилазину, після чого в стандартних умовах, на скелетованій гілці нижньої щелепи накладали фрезевий отвір, просвіт якого поєднувався з порожниною рота за рахунок перфоративного отвору, завдяки чому у вогнищі ранового процесу створювалося джерело інфікування кісткової рани мікрофлорою, що населяє порожнину рота. Тварин виводили з експе-

рименту по 5 на 10-у, 20-у і 30-у добу. Протокол дослідження схвалений Комісією з питань біоетики ДУ ІНВХ ім. В. К. Гусака НАМНУ (протокол № 1/2 від 15.02.2010 р.).

Кількість цитокінів визначали за допомогою фотометра для багатофункціонального аналізу «Synergy HT Bio-Tek® Instruments» (США). Статистичну обробку отриманих результатів проводили із застосуванням статистичних пакетів «Stadia 6.0» з використанням адекватних методів біостатистики [12, 13].

Отримані результати

На діаграмі наведені дані щодо рівня досліджуваних агентів по групах спостереження (рис. 1), які свідчать про нерівномірний розподіл показників у групах дослідження.

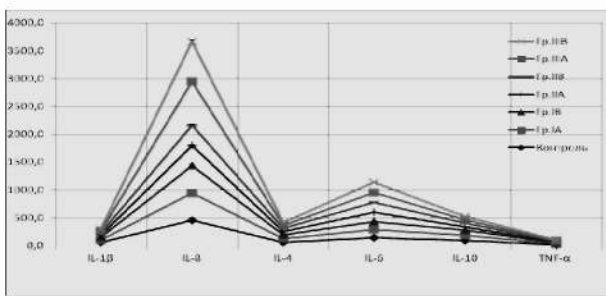


Рис. 1. Розподіл груп дослідження за середніми показниками цитокінів

Так, найвищі показники IL-1β були в групі контролю на 10-ту добу. При цьому динаміка їхніх змін була недостовірною ($p > 0,05$). Аналогічна ситуація спостерігалася в Гр.ІА і Гр.ІВ на 10-ту добу. Рівень IL-1β на 20-ту добу в цих групах знизився в 1,3 раза ($p < 0,05$) і далі практично не змінився (розходження недостовірні, $p > 0,05$). Найнижчі показники рівня IL-1β на 10-ту добу були в Гр.ІІА і Гр.ІІВ - в 1,5 рази нижче в порівнянні з контролем ($p < 0,05$). Однак, динаміка даного ЦК у наступні строки виявилася недостовірною ($p > 0,05$). Найбільша динаміка рівня IL-1β у крові тварин спостерігалася в Гр.ІІІА і Гр.ІІІВ. Так, показники IL-1β на 10 добу були в 1,2 раза нижче (відмінність вірогідна, $p < 0,05$), ніж у контролі, та знижувалася на 20-ту і 30-ту добу в 1,3 раза ($p < 0,05$).

Найнижчі показники IL-8 на 10-ту добу виявлені в Гр.ІІА і Гр.ІІВ групах, де вони знижувалися до 20-ту добу в 1,6 раза, відмінність вірогідна ($p < 0,05$). Розходження в цих групах між 20-ю і 30-ю добою були недостовірні ($p > 0,05$). Найвищі показники IL-8 спостерігалися на 10-ту добу в Гр.ІІІА і Гр.ІІІВ і перевищували такі в інших групах у 1,8 раза та вірогідно знижувалася на 20-ту і 30-ту добу в 1,2 раза ($p < 0,05$).

У групах контролю, Гр.ІА, Гр.ІВ, Гр.ІІА і Гр.ІІВ спостерігалася зростання показників рівня IL-4 до 20 доби в 1,2 раза (група контролю - в 1,4 раза), всі розходження достовірні ($p < 0,05$). На 30-ту добу зміни в цих групах були недостовірні ($p > 0,05$). Зворотна залежність спостерігалася в Гр.ІІІА і Гр.ІІІВ, де на 10-ту добу рівень IL-4 перевищував такий у інших групах у 1,2 раза ($p < 0,05$) і вірогідно

знижувався на 20-ту і 30-ту добу в 1,2 раза ($p < 0,05$).

Рівень IL-6 знижувався в усіх групах. При цьому в групі контролю, Гр.ІА і Гр.ІВ на 20-ту добу було виявлене зниження в 1,2 раза, розходження достовірні ($p < 0,05$). У Гр.ІІА і Гр.ІІВ на 20-ту добу IL-6 знижувався в 1,6 раза, що вірогідно ($p < 0,05$). У Гр.ІІІА і Гр.ІІІВ показники вірогідно знижувалися в 1,5 раза на 20-ту добу і в 1,7 раза - на 30-ту, всі розходження достовірні ($p < 0,05$).

Найвищий рівень IL-10 був на 10-ту добу в групі контролю, Гр.ІА і Гр.ІВ та мав тенденцію до росту в наступні строки (розходження недостовірні, $p > 0,05$). При цьому рівень IL-10 у Гр.ІІА, Гр.ІІВ, Гр.ІІІА й Гр.ІІІВ на 10-ту добу був у 1,6 раза вірогідно нижче групи контролю ($p < 0,05$). Зміна показників IL-10 у цих групах у наступний термін була недостовірною ($p > 0,05$).

Зниження рівня TNF-α у крові тварин виявили в усіх групах дослідження. Однак у групі контролю, Гр.ІА, Гр.ІВ, Гр.ІІА і Гр.ІІВ ці зміни були найбільш виражені на 30-ту добу - знижувалися в 1,3 раза, вірогідно ($p < 0,05$). У Гр.ІІІА і Гр.ІІІВ ці зміни були найбільш виражені на 20-ту добу і знижувалися в 1,6 раза (розходження достовірні, $p < 0,05$). Найвищі середні показники отримані в групі контролю, Гр.ІА, Гр.ІВ, Гр.ІІА і Гр.ІІВ, розходження невірні ($p > 0,05$). Вірогідно низькі середні показники були в Гр.ІІІА і Гр.ІІІВ.

Аналіз і обговорення результатів дослідження

Таким чином, найнижчі показники рівня IL-1β спостерігалися в групах тварин за використання супернатанту, більш виражена динаміка зміни показників була в групах із МСК. Середній рівень IL-8 у крові тварин був найнижчим у групах із ККС, він вірогідно ($p < 0,05$) знижувався на 20-ту добу. Найвищий рівень цього ЦК виявлений у групах із МСК і вірогідно знижувався на 20-ту і 30-ту добу. «Початковий» рівень IL-4 був вище в групах із МСК, де він знижувався на 20-ту і 30-ту добу. В інших групах показники IL-4 були початково низькими і підвищувалися на 20-ту добу ($p < 0,05$). Зниження рівня IL-6 на 20-ту і 30-ту добу виявили в групах із МСК, за вірогідно високого (в 1,7 раза, $p < 0,05$) відносно групи контролю, початкового (на 10-ту добу) рівня. Рівень IL-10 найвищим був у групі контролю, Гр.ІА і Гр.ІВ. Достовірні зміни цього ЦК у наступний термін не виявлені. Показники рівня TNF-α в крові вірогідно знижувалися у всіх досліджуваних групах, причому в групах, де використовувалася культура МСК, основна динаміка спостерігалася в більш ранні строки (на 10-ту добу).

Відомо, що IL-1 сприяє розвитку запальної реакції завдяки хемотаксису нейтрофілів і моноцитів та підсилює виділення гістаміну базофілами, дегрануляцію еозинофілів і продукування простагландинів. Впливаючи на ендотелій, IL-1 збільшує його проникність, стимулює виділення фактора активації тромбоцитів (PAF), а також підсилює адгезію лімфоцитів і нейтрофілів до ендотеліоцитів.

IL-1 є одним з основних регуляторів імунної і запальної відповіді. Він діє практично на всі типи клітин. Виділяється в основному моноцитами і макрофагами, але також МСК, хондроцитами, клітинами Лангерганса, клітинами глії, мезангіальними клітинами, ендотеліоцитами, В- і Т-лімфоцитами, а його індукторами є ендотоксини стінок грам-негативних бактерій, а також віруси, бактерії і дріжджі; екзотоксини і пептидоглікани бактерій.

Клітинами-продуцентами IL-8 є мононуклеарні фагоцити, поліморфноядерні лейкоцити, ендотеліальні клітини, макрофаги, лімфоцити, епітеліальні клітини, фібробласти, клітини епідермісу, стромальні стовбурові клітини кісткового мозку, зокрема МСК. Основна функція IL-8 полягає в забезпеченні хемотаксису в зону запалення різних типів клітин: нейтрофілів, моноцитів, еозинофілів, Т-клітин.

Інтерлейкін-4 (IL-4) належить до протизапальних цитокінів, що продукується переважно Т-лімфоцитами та обмежено гладкими клітинами, базофілами, В-лімфоцитами і стромальними клітинами кісткового мозку. Основна функція IL-4 – це контроль проліферації, диференціювання і функцій В-лімфоцитів, тобто антитільної відповіді. Ще більшою мірою проявляється його інгібуюча дія відносно моноцитів/макрофагів. IL-4 блокує і спонтанну, й індуквану продукцію прозапальних цитокінів: IL-1, IL-6, IL-8, TNF моноцитами і макрофагами, підвищуючи одночасно продукцію G-CSF і M-CSF цими клітинами. Тому вважають, що підвищення рівня IL-4 має компенсаторний, контррегуляційний характер відносно прозапальних цитокінів, і рівень IL-4 виступає як фактор, що стабілізує перебіг захворювання.

Інтерлейкін-6 (IL-6) – прозапальний цитокін, що продукується клітинами різних типів – макрофагами, Т- і В-лімфоцитами, фібробластами, ендотеліальними, епідермальними і мікрогліальними клітинами, хондроцитами, остеобластами, остеоцитами. Його дія спрямована на посилення продукування білків гострої фази. У кістковій тканині за участі IL-6 відбуваються диференціація і підвищення активності остеокластів, за допомогою чого посилюється резорбція кісткової тканини.

TNF- α проявляє вибіркочу цитотоксичність відносно деяких пухлинних клітин; активує гранулоцити, макрофаги, ендотеліальні клітини, гепатоцити (продукування гострофазних білків), остеокласти і хондроцити (резорбція кісткової і хрящової тканин), синтез інших прозапальних ЦК, стимулює проліферацію і диференціювання нейтрофілів, фібробластів, ендотеліальних клітин (ініціює ангіогенез), гемопоетичних клітин, Т- і В-лімфоцитів; підсилює надходження нейтрофілів із кісткового мозку в кров; бере участь не тільки в захисних реакціях, а і в процесах деструкції і репарації, супутніх запаленню; служить одним із медіаторів деструкції тканин, що має місце при тривалому хронічному запаленні.

Висновки

Отже, вплив культур МСК на перебіг гнійно-запального процесу не обмежується гуморальними факторами, а реалізується за рахунок наявності клітин МСК безпосередньо в зоні регенерації, які беруть участь у ланцюгу взаємної паракринної регуляції остеогенних клітин і здатні усунути дисбаланс в умовах запально-деструктивного процесу.

Література

1. Болезни пародонта. Патогенез, диагностика, лечение / [А. С. Григорьян, А. И. Грудянов, Н. А. Рабухина, О. А. Фролова]. – М. : МИА, 2004. – 320 с.
2. Мазур И. П. Некоторые аспекты патогенеза резорбции альвеолярного гребня при генерализованном пародонтите / И. П. Мазур, В.В. Поворознюк // Пародонтология. – 1999. – № 3. – С. 19-23.
3. Иванов В. С. Заболевания пародонта / В. С. Иванов. – М. : МИА, 1998. – 122 с.
4. Данилевский Н. Ф. Заболевания пародонта / Н. Ф. Данилевский, А. В. Борисенко. – К. : Здоров'я, 2000. – 461 с.
5. Кухарчук А. Л. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки / А. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сирман. – Черновцы : Золоті литаври, 2004. – 505 с.
6. Шумаков В. И. Достижения и перспективы развития трансплантологии и искусственных органов в России / В. И. Шумаков // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2005. – № 3. – С. 6–9.
7. Денисов В. К. Особенности современного этапа развития трансплантологии в Украине / В. К. Денисов // Матеріали ІІІ з'їзду трансплантології України. – Донецьк, 2004. – С. 14–19.
8. Докторов А. А. Морфофункциональная характеристика эндоста в связи с проблемой ремоделирования кости / А. А. Докторов, Пак Гван Чор // Архив патологии. – 1998. – Т. 60, № 5. – С. 19-23.
9. Влияние остеотропных материалов на культуру фетальных фибробластов крыс / С. П. Ярова, А. Г. Попандоуло, А. П. Брашкин, И. А. Разенкова // Вісник стоматології. – 2007. – № 3. – С. 2-7.
10. Транспортные свойства остеотропных материалов, как носителей культуры клеток / [С. П. Ярова, А. Г. Попандоуло, А. П. Брашкин, А. И. Разенкова] // Вісник стоматології. – 2007. – № 4. – С. 125–131.
11. Брашкин А. П. Биотехнологические методы тестирования стоматологических имплантационных материалов / А. П. Брашкин // Світ біології та медицини. – 2009. – № 2. – С. 30-35.
12. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии / Г. Г. Автандилов. – М. : Медицина, 2002. – 240 с.
13. Основы компьютерной биостатистики: анализ информации в биологии, медицине и фармации статистическим пакетом MedStat / [Ю. Е. Лях, В. Г. Гурьянов, В. Н. Хоменко, В. А. Панченко]. – Донецк : Папакица Е.К., 2006. – 214 с.

**Стаття надійшла
6.02.2014 р.**

Резюме

Приведено патогенетическое обоснование применения мезенхимальных стволовых клеток и их продуцентов в коррекции регуляторных нарушений при воспалительно-деструктивном процессе челюстной кости. Исследование проведено на 195 нелинейных белых половозрелых крысах-самцах породы Wistar со спонтанным пародонтитом, которым в ходе эксперимента накладывали фрезевое отверстие на ветвь челюсти с последующим изучением показателей про- и противовоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10) крови животных с участием в процессе регенерации остеопластических материалов, мезенхимальных стволовых клеток и их продуцентов. Изучена эффективность регенерации костной ткани в зоне деструкции при воздействии ростовых гуморальных факторов (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-6, IL-10) в эксперименте как факторов индукции остеогенеза. Изучена эффективность регенерации костной ткани в зоне деструкции при воздействии клеточной культуры МСК в эксперименте как регуляторного и индуцирующего фактора регенерации.

Ключевые слова: костная ткань челюсти, воспалительно-деструктивный процесс, регенерация, цитокины, TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10.

Резюме

Наведено патогенетичне обґрунтування застосування мезенхімальних стовбурових клітин і їхніх продуцентів у корекції регуляторних порушень при запально-деструктивному процесі щелепної кістки. Дослідження проведене на 195 нелінійних білих статевозрілих щурах-самцях породи Wistar зі спонтанним пародонтитом, яким у ході експерименту накладали фрезований отвір на гілку щелепи з подальшим вивченням показників про- і протизапальних цитокинів (TNF - α , IL - 1 β , IL - 4, IL - 6, IL - 8, IL - 10) крові тварин з участю в процесі регенерації остеопластичних матеріалів, мезенхімальних стовбурових клітин і їхніх продуцентів. Вивчена ефективність регенерації кісткової тканини в зоні деструкції під дією ростових гуморальних чинників (TNF - α , IL - 1 β , IL - 4, IL - 8, IL - 6, IL - 10) у експерименті як чинників індукції остеогенезу. Вивчена ефективність регенерації кісткової тканини в зоні деструкції під дією клітинної культури МСК у експерименті як регуляторного та індукуючого чинника регенерації.

Ключові слова: кісткова тканина щелепи, запально-деструктивний процес, регенерація, цитокини, TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10.

Summary

The article deals with the pathogenic rationale of application of mesenchymal stem cell and their derivatives in the correction of regulator violations at the inflammatory-destructive process of jawbone. The research work was conducted on 195 non-linear whiter viripotent male rats of Wistar breed with spontaneous periodontitis. During the experiment, the mill aperture was applied on the jaw with the following studies of indicators pro- and anti-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10) of animal's blood together with bonegraft, MSCs and their producers. The effectiveness of bone regeneration in the area of destruction under the influence of the growth of humoral factors (TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-6, IL-10) in the experiment as the factor of induction of bone formation is studied. The efficiency of regeneration of bone tissue in the zone of destruction under the influence of cell culture MSCs in the experiment as a regulatory factor and inducing regeneration is studied.

Key words: bone tissue, inflammatory-destructive process, the mechanisms of regeneration of braids, cytokines, mesenchymal stem cells, cell therapy.