

Materials and methods. T and B-lymphocytes proliferative activity, suppressive activity of monocytes/macrophages, cellular and humoral neuroautoimmune reactions in rats with induced EAE were researched.

Results. Treatment of experimental rats with induced allergic encephalomyelitis via suboccipital administration of MSCs transfected by IL-10 gene that causes prolonged inhibition of the functional activity of T-lymphocytes, causes activation function of suppressor of monocytic series on 35th day followed by inhibition of their activity. Treatment with MSCs transfected by gene IL-10 does not affect the dynamics of cell neuro-sensitisation in animals with EAE, which increases on 60th day, significantly reduces the titer of antibodies in the blood serum of heterogeneous NSE protein in all study time and the level of antibodies to heterologous proteins S100 only on 35th day of the study. Conducted treatment does not affect the increased level of antibodies to the homo- and heterogeneous protein MBP in all time of observation.

Key words: experimental allergic encephalomyelitis, transfected mesenchymal stem cells of IL-10 gene, MBP antibodies.

Відомості про авторів:

Руденко Валентина Андріївна - к.б.н., провідний науковий співробітник ДУ «Інститут нейрохірургії ім.акад. А.П.Ромоданова НАМН України». Адреса: 04050, м.Київ, вул.. Платона Майбороди, 32, тел.: (044) 483-36-84.

Бельська Людмила Миколаївна - к.б.н., старший науковий співробітник ДУ «ІНХ НАМН України».

Гнедкова Ірина Олександрівна - к.мед.н., ст. н. співробітник ДУ «ІНХ НАМН України».

Пічкур Олександр Леонідович - науковий співробітник ДУ «ІНХ НАМН України».

Вербовська Світлана Анатоліївна - молодший науковий співробітник ДУ «ІНХ НАМН України».

Похоленко Яніна Олександрівна - науковий співробітник ДУ «ІГРМ НАМН України».

УДК 616.71-018.4

© СЕ-ФЕЙ, 2015

Се-Фей

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОЇ РАДІАЛЬНОЇ УДАРНО- ХВИЛЬОВОЇ ТЕРАПІЇ НА ІМУННІ МАРКЕРИ СИРОВАТКИ КРОВІ У КРОЛИКІВ З ТРАВМОЮ КІСТКИ

Національна медична академія післядипломної освіти
імені П.Л.Шупика, м.Київ

Актуальність. Екстракорпоральна ударно-хвильова терапія (ЕХУХТ) активує кісткоутворюючі процеси, однак механізм цього ефекту до теперішнього часу не в'яснений, окремі роботи свідчать про інтенсифікацію імунокомпетентних клітин.

Мета. Вивчення впливу ЕРУХТ на активність імуних клітин при експериментальній травмі кісток.

Матеріали та методи. У 24 кроликів в асептичних умовах створювали дефект метадіафізу великогомілкової кістки шляхом її перфорації. Тварини дослідної групи отримували на зону травми кістки 4 сеанси ЕРУХТ, тварини контрольної групи ЕРУХТ не отримували. В обох групах тварин до травми і через 2, 15, 30 і 45 днів після травми в сироватці крові вивчали цитотоксичну активність лімфоцитів, цитотоксичну активність макрофагів.

Результати. Показано, що на фоні травми кістки спостерігається частковий параліч функціональної активності імунних маркерів, при цьому ЕРУХТ не тільки відновлює нормальну активність імунних клітин, але й приводить до їх зростання до кінця дослідження.

Ключові слова: екстракорпоральна ударно-хвильова терапія, регенерація кісткової тканини, імунні клітини.

Вступ. Екстракорпоральна радіальна ударно-хвильова терапія (ЕРУХТ) починаючи з середини 90-х років минулого сторіччя знайшла застосування при лікуванні свіжих переломів довгих кісток, псевдоартрозів і незрослихся переломів. Не дивлячись на основний ефект активізації кісткоутворювальних процесів, механізм впливу цього методу до теперішнього часу залишається нев'язаним [1, 3, 10]. Встановлено, що під впливом ЕРУХТ спостерігається значний підйом кількості Р-субстанції – речовини, яка володіє імунореактивними властивостями і є у кістковому мозку кісток [4, 8]. Також відмічено, що ЕРУХТ підвищує інтенсивність тиску і підсилює функціональну активність імунокомпетентних клітин, зокрема лімфоцитів, лейкоцитів, а також активізує утворення імуноглобулінів [5, 6]. Є також експериментальні дослідження, які свідчать про підвищення рівня гістохімічних імунних маркерів (ангіогенних, остеогенних) у кістковому регенераті тварин під впливом ЕРУХТ[7]. Наведені дані обумовлюють необхідність вивчення впливу ЕРУХТ на імунні клітини при наявності експериментальної травми кістки.

Матеріал і методи. Експериментальні дослідження на тваринах виконані у віварії НМАПО імені П.Л.Шупика. Досліди проведено на кролях породи Шиншила масою 2,7-2,9 кг. Кроликів утримували в умовах клініки для експериментальних тварин на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до їжі та води. Дослідження проведено у 2014 році. У кроликів дефект кісткової тканини виконували шляхом наскрізної перфорації проксимального метадіафізу великогомілкової кістки у фронтальній площині хірургічним кортикальним свердлом діаметром 3 мм. Оперативне втручання на кролях виконували в стерильних умовах (операційна віварія) під комбінованою анестезією: внутрішньом'язево вводили 3% розчин кетаміну (0,3мл/кг), місцево – 0,5% розчин новокаїну (0,4 мл/кг). Після формування дефекту проксимального метадіафізу великогомілкової кістки рану зашивали, іммобілізацію оперованої кінцівки не проводили. Кролі були поділені на 2 групи: контрольна (12 кролів) та дослідна (12 кролів). Кролям дослідної групи на 3, 6, 9 і 12 добу після операції проводили сеанси ЕРУХТ. При цьому використовувався апарат фірми Storz Medical Masterplus MP 200, кількість ударів на зону дирчатого дефекту кістки становила 1000, при частоті ударів 1-21 Герц, робочому тиску 1-5 Бар., використовувались головки R15, діаметром 15 мм з максимальної енергією 0,38 мДж/мм кв. У кролів контрольної групи ЕРУХТ не проводилась. Експеримент на тваринах проводили за всіма правилами Європейської конвенції захисту хребтових тварин, котрі використовуються в експериментальних та інших цілях.

Імунологічні дослідження виконували в лабораторії імуномодуляторів ІЕПОР імені Р.Е.Кавецького НАН України, вони консультовані проф. Потебнеї Г.П. В експерименті імунологічні маркери досліджували у 24 кролів контрольної та дослідної груп – по 12 кролів у яких на 2, 15, 30, 45 добу після операції виконували забір крові. Дослідження функціональної активності імунних клітин у сироватці крові (СК) проводили в МТТ-тесті методом Т.Р.Stankojkovicetal. у власній модифікації [2, 9]. При цьому досліджували

цитотоксичну активність лімфоцитів, антитіл залежну цитотоксичність лімфоцитів, цитотоксичну активність макрофагів.

Результати та їх обговорення. При дослідженні цитотоксичності лімфоцитів було встановлено, що травмування кістки призводить на другу добу до різкого падіння цитотоксичної активності лімфоцитів у СК кроликів, як контрольної групи – до $3,64 \pm 0,77\%$, проти $43,81 \pm 1,22\%$, так і дослідної групи – до $2,82 \pm 0,08\%$ проти $41,65 \pm 1,31\%$ на початку експерименту, при $p < 0,001$ в обох групах тварин (рис. 1).

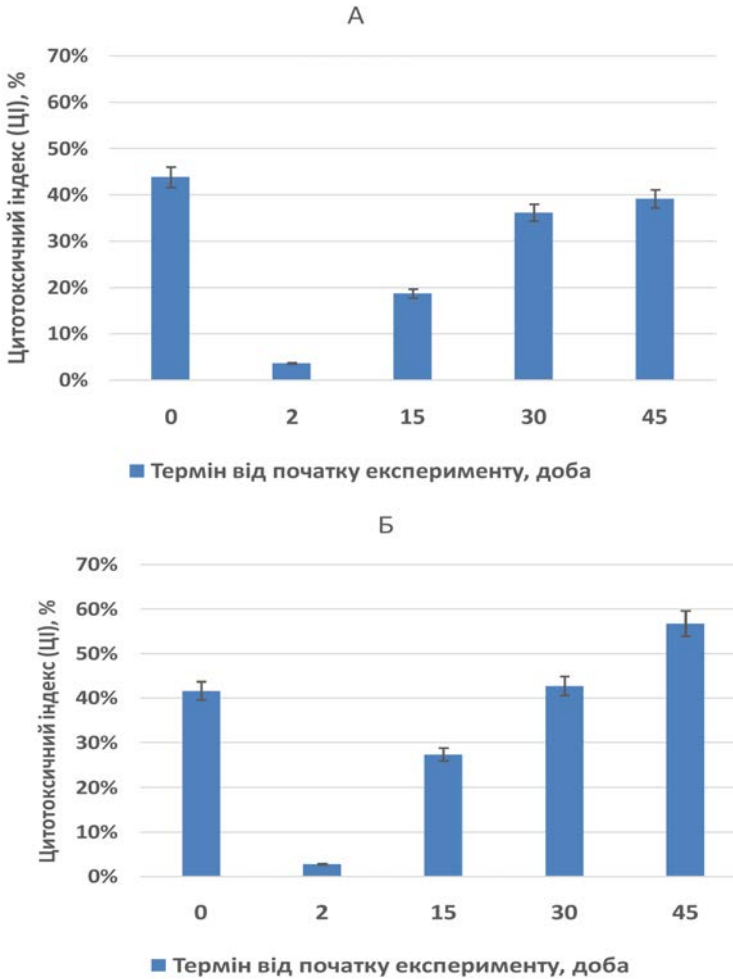
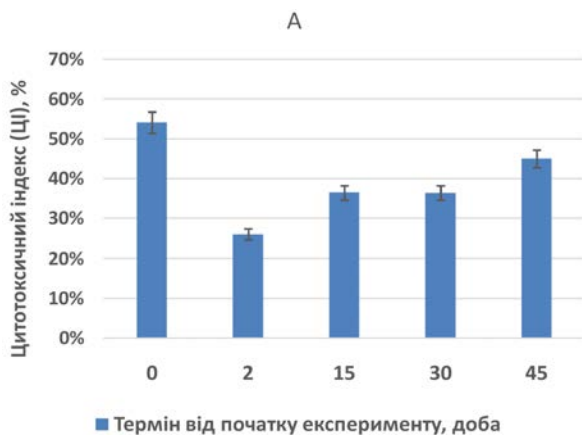


Рис. 1. Цитотоксична активність лімфоцитів у кроликів контрольної (А) та дослідної (Б) груп

ІМУНОЛОГІЯ ТА АЛЕРГОЛОГІЯ

Скоріш за все, різке зниження функціональної активності лімфоцитів відбувалось через больовий синдром. При цьому не визначено достовірних відмінностей показників між контрольною і дослідною групами кроликів у показниках цитотоксичної активності лімфоцитів як на початку експерименту, так і на другу його добу ($p > 0,05$). На 15- та 30-ту добу активність лімфоцитів у кроликів обох груп відновлювалась і становила у кроликів контрольної групи $18,71 \pm 8,43\%$ та $36,18 \pm 1,5\%$ відповідно, у кроликів дослідної групи $27,43 \pm 6,15\%$ та $42,74 \pm 8,27\%$, при $p < 0,01$ у порівнянні з попередніми термінами і двома групами кроликів. На 45 добу цитотоксична активність лімфоцитів у кроликів контрольної групи хоча й підвищувалась, проте ще була нижче вихідних показників – $39,15 \pm 11,56$ ($p < 0,05$), в той же час у кролів дослідної групи вона була навіть вища за початковий рівень – $56,80 \pm 3,03\%$ ($p < 0,02$). При дослідженні антитіло залежної цитотоксичності лімфоцитів динаміка процесу співпадала з такою при дослідженні цитотоксичної активності лімфоцитів. Аутологічна СК значно знижувала цитотоксичну активність на другу добу після травмування кістки тварин. Показники цитотоксичності на



даний термін становили у контрольних тварин $26,07 \pm 3,17\%$, проти $54,09 \pm 1,89\%$ - на початку дослідження; у дослідних тварин – $24,09 \pm 4,61\%$ проти $51,19 \pm 4,56$, при p в обох групах тварин $< 0,001$ (рис. 2).

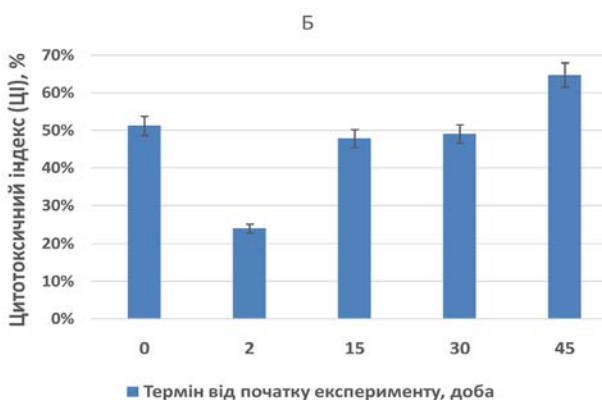


Рис. 2. Антитіло-залежна цитотоксична активність лімфоцитів у кролів контрольної (А) та дослідної (Б) груп

На 15- та 30-тудобу після травми та проведеного лікування ЕРУХТ (дослідна група) антитіло залежна цитотоксичність лімфоцитів становила у контрольній групі тварин відповідно $36,45 \pm 0,92\%$ та $36,39 \pm 0,14\%$, у дослідних тварин – $47,85 \pm 2,53\%$ та $49,07 \pm 3,15\%$ при $p < 0,05$ між двома групами тварин. На 45-ту добу антитіло залежна цитотоксичність лімфоцитів піднялася до $45,0 \pm 0,67\%$ у контрольних тварин і до $64,75 \pm 3,67\%$ - у дослідних ($p < 0,02$). При дослідженні цитотоксичної активності макрофагів було відмічено зниження їх активності на 2-гу та 15-ту добу після травмування у обох групах тварин. Показники цитотоксичності на дані терміни становили $11,61 \pm 1,09\%$ і $9,88 \pm 5,38\%$ відповідно у кроликів контрольної групи та $12,8 \pm 2,16\%$ і $16,01 \pm 4,32\%$ - у кроликів дослідної групи (рис. 3), $p < 0001$ в обох групах в порівнянні з нормативом.

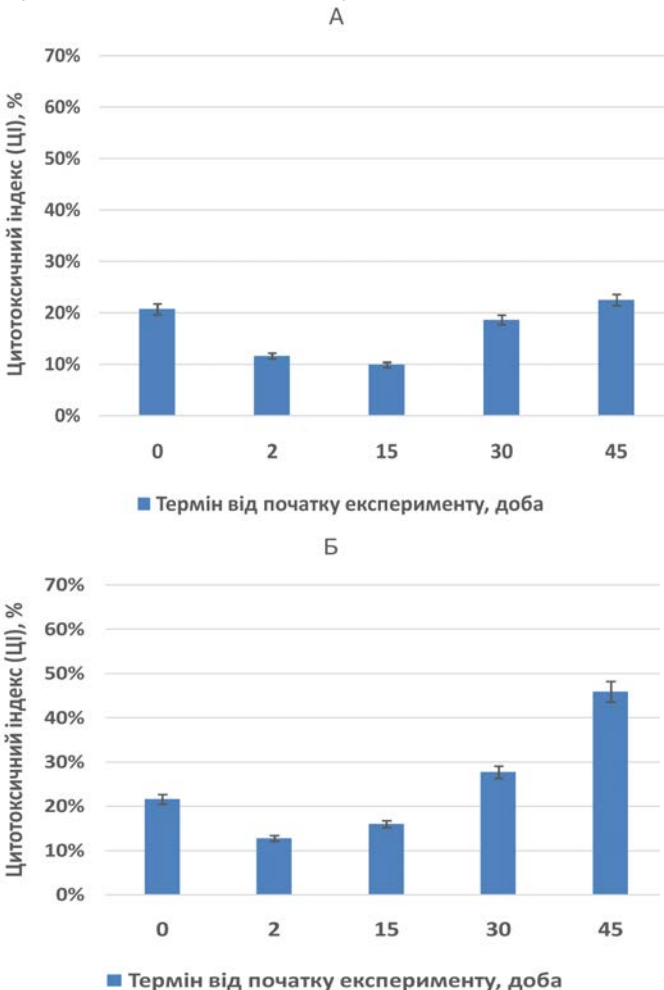


Рис. 3. Цитотоксична активність макрофагів у кролів контрольної (А) та дослідної (Б) груп

На 30-ту добу рівень функціональної активності макрофагів майже відновлювався до початкового рівня ($20,69 \pm 1,68\%$) у контрольних тварин, і становив $18,65 \pm 0\%$. В той же час рівень функціональної активності макрофагів у кроликів дослідної групи до цього терміну суттєво перевищував норматив ($21,64 \pm 5,07\%$) і досягав показників $27,71 \pm 5,09$ ($p < 0,05$). На 45-ту добу рівень цитотоксичності макрофагів у кроликів контрольної групи не відрізнявся достовірно від нормативу – ($20,69 \pm 1,68$) і складав $22,5 \pm 2,63$, $p > 0,05$. На 45-ту добу відмічаємо навіть стимуляцію макрофагів у тварин дослідної групи. Їх цитотоксичність на даний період дослідження становила $45,93 \pm 1,17\%$, $p < 0,001$ в порівнянні з нормативом.

Обговорення результатів. Як показали виконані експериментальні дослідження у кроликів після травми великогомілкової кістки відбувається зниження активності імунних клітин у СК, в т.ч. знижується цитотоксична активність лімфоцитів, антитілозалежна цитотоксичність лімфоцитів, цитотоксична активність макрофагів. У кроликів обох груп до 15, 30 і 45 доби після травми поступово підвищувалась активність імунних клітин, проте до кінця дослідження вона у тварин контрольної групи була достовірно нижче контрольного рівня. В той же час у тварин дослідної групи під впливом ЕРУХТ відбувалось більш активне відновлення функції імунних клітин, яка наприкінці експерименту достовірно підвищувала вихідний рівень, за показниками цитотоксичної активності лімфоцитів, антитілозалежної цитотоксичності лімфоцитів, цитотоксичної активності макрофагів. Результати отриманих досліджень свідчать про те, що одним з факторів позитивного впливу ЕРУХТ на репаративну регенерацію кісткової тканини є не тільки більш швидка нормалізація активності імунних клітин після травми кістки, а і підвищення їх активності наприкінці дослідження.

З отриманих даних можна зробити наступні **висновки**: Експериментальні дослідження на кроликах показали, що травма кістки призводить до значного зниження функціональної активності імунних клітин на ранніх термінах досліду (друга доба після травми), та прояву супресорного впливу аутологічної СК на функціональну активність макрофагів на 15 добу після травми. В результаті травми кістки відмічається частковий параліч функціональної активності імунних клітин, при цьому ЕРУХТ не тільки відновлює нормальну активність імунних клітин, але в кінцевому рахунку призводить до їх збільшення, що позитивно впливає на процеси репаративної регенерації кісткової тканини.

Література

1. Борзых А.В., Соловьев И.А., Труфанов И.М., Попов С.В. Особенности лечения переломов и ложных суставов ладьевидной кости у спортсменов // Спортивная медицина. – 2013. - №1. - С.29-33.
2. Дворченко О.С., Діденко Г.В., Чередарчук О.І. та ін. Моделивання ксеногенних клітинних систем на твердих фазах з використанням пухлин-асоційованих та ембріональних антигенів та їх застосування в протипухлинній терапії. Доповіді НАН України. – 2007. - №12. – С.155-161.
3. Егорова Е.А., Васильев А.Ю. Экстракорпоральная ударно-волновая терапия в лечении переломов костей конечностей // Спортивная медицина. – 2013. - №1. - С.12-17.
4. Островський О.А. Зміни в клітинах і тканинах живих організмів під впливом ударно-хвильової терапії (огляд спеціальної літератури) // Спортивна медицина. – 2013. - №1.– С.7-11.

5. Ching-Jen Wang, Feng-Shing Wang, Kuender D. Yang. Biological effects of extracorporeal shockwave in bone healing; a study in rabbits// Arch. Orthop. Trauma Surg. – 2012. - Vol. 31. -P. 756-764.
6. Dahmen G.P. Skrodies: Extracorporeal stoss wellen therapia (ESWT) in knochennahen weichteil beveichan der Schulter // Extracta Orthoped. – 1992. – Vol.11. – P. 25-27.
7. Moretti B., Notarnicola A., Moretti L., Patella S. Bone healing induced by ESWT// Clinical cases in mineral and bone metabolism. - 2009. - Vol. 6, №2. - P.155-158.
8. Shin C. Neurogenic Substance P stimulates osteogenesis in vitro // Peptides. – 1997. – №18. – P. 3223-3232.
9. Stanojkovic T.P., Zizak Z., Srdic T. et al. The antitumor immune response in HER-2 positive, metastatic breast cancer patients // J. Transl. Med. – 2005. - №3. – P.13-16.
10. Vulpiani M.C., Vetrano M., Conforti F., Minutolo L. Effects of extracorporeal Shock Wave Therapy on Fracture Nonunions // The American Journal of Orthopedics. - 2012. - Vol. –41, №9. P.122-127.

Се-Фей

**Экспериментальное исследование влияния
экстракорпоральной радиальной ударно-волновой
терапии на иммунные маркеры сыворотки крови
у кроликов с травмой кости**

**Национальная медицинская академия последипломного образования
имени П.Л.Шупика**

Актуальность. Экстракорпоральная радиальная ударно-волновая терапия (ЭРУВТ) активизирует костеобразовательные процессы, однако механизм этого эффекта до настоящего времени не выяснен, отдельные работы показывают интенсификацию иммунокомпетентных клеток.

Цель. Изучить влияние ЭРУВТ на активность иммунных клеток при экспериментальной травме костей.

Материалы и методы. У 24 кроликов в асептических условиях создавали дефект метадиафиза большеберцовой кости путем ее перфорации. Животные опытной группы получали на зону травмы кости 4 сеанса ЭРУВТ, животные контрольной группы ЭРУВТ не получали. В обеих группах животных до травмы и через 2, 15, 30 и 45 дней после травмы в сыворотке крови изучали антителозависимую цитотоксичность лимфоцитов, цитотоксическую активность лимфоцитов и макрофагов.

Результаты. Показано, что на фоне травмы кости наблюдается частичный паралич функциональной активности иммунных маркеров, при этом ЭРУВТ не только восстанавливает нормальную активность иммунных клеток, но и приводит к их росту к концу исследования.

Ключевые слова: экстракорпоральная ударно-волновая терапия, регенерация костной ткани, иммунные клетки.

Experimental studying extracorporeal shock-wave therapy effect on the immune markers of serum in rabbits with bone trauma

Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education

Introduction. The extracorporeal shock wave therapy (ESWT) leads to the activity of reparative osteogenesis, but this effect is not completely studied till today.

Aim. To study extracorporeal shock wave therapy effect on activity of the immune cells in case of experimental bone trauma.

Material and methods. 24 rabbits were inflicted with shinbone metadiaphysis defect by the perforation in aseptic conditions. The animals of the treatment group received 4 courses of extracorporeal shock wave therapy within the area of bone trauma, while control group animals were not treated with extracorporeal shock wave therapy. Both groups of animals were subjected to blood analysis with studying cytotoxic activity of lymphocytes, macrophages and antibodies-dependent cytotoxicity of lymphocytes prior to trauma and 2, 15, 30 and 45 days after its infliction.

Results. The findings of the study showed that the experimental bone trauma leads to partial paralysis of the immune markers functional activity; extracorporeal shock wave therapy leads to the increase in the number of immune cells and even restores their normal activity to the end of the study.

Key words: extracorporeal shock wave therapy, reparative osteogenesis, immune cells.

Відомості про автора:

Се-Фей - аспірант кафедри ортопедії і травматології №1 НМАПО імені П.Л.Шупика.
Адреса: м. Київ, вул. Кондратюка, 8, МКЛ №8, тел.: (044) 432-25-79.