

ПАТОФІЗІОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ МЕХАНІЗМІВ ДІЇ ОСТЕОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ В ЕКСПЕРИМЕНТІ IN VITRO НА МОНОНУКЛЕАРИ КРОВІ ХВОРИХ ІЗ ТРАВМАМИ ЛОБНОЇ КІСТКИ

¹Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова
(дир. – В.В. Паненко);

²Вінницька обласна клінічна лікарня ім. М.І. Пирогова
(в.о. ректора – проф. В.В. Петрушенко);

³Державна установа «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка
Національної академії медичних наук України»
(дир. – акад. НАМН України, проф. Д.І. Заболотний)

Сучасні підходи до патогенетичного лікування травм голови повинні базуватися на врахуванні всіх можливих механізмів розвитку посттравматичної хвороби, в тому числі і ролі імунних реакцій в процесах регенерації кісткового матриксу [5, 9, 12]. Репарація структур кісток при цьому в значній мірі може залежати від активуючих стимулів з боку клітин імунної системи, що доведено в ряді наукових робіт [9, 13].

На сьогодні існують декілька препаратів різної спрямованості, що впливають на процеси травматичного запалення, стан мембран клітин та регенерації пошкодженої кістки. Є достатньо обґрунтовані дослідження загального плану про значення вітаміну D в метаболічних процесах в мезенхімальній тканині, які впливають на формування кісткового матриксу і загальну мінералізацію кісток, впливають на клітини, що приймають участь в стабілізації мембран клітин різного гістогенезу [8]. Важливими для процесів регенерації кісток є регулятори кальцієво-фосфорного обміну, які стимулюють остеобласти та знижують активність остеокластів. Одним з препаратів цієї групи є остеогенон, основою якого є осейно-гідроксиапатитові сполуки, які стимулюють

локальні регулятори ремоделювання кісткової тканини. Це трансформуючий фактор росту – TGF-1 β , остеокальцин, інсуліноподібні фактори росту – IGF 1,2, колаген першого типу [11, 12]. Враховуючи ці дані, доцільним буде визначити вплив різних препаратів, що застосовуються при лікуванні фронтальних травм черепа (лобна кістка, кістковий скелет носа), на патофізіологічні механізми запалення (інтерлейкін-1 β , інтерлейкін-10, γ -інтерферон) стабілізацію мембран клітин, рівень регенераторних цитокінів.

Матеріал та методи досліджень

Дослідження проведено на культурі мононуклеарів крові, які було отримано від 29 пацієнтів з травмою лобної кістки (ТЛК). Вік обстежених – від 19 до 40 років, жінок було ~ 30%. Мононуклеари отримували методом осадження в градієнті щільності фіколл-верографіна із крові пацієнтів в перші дні їх госпіталізації [4].

В умовах in vitro визначався вплив на мононуклеари крові ремоделюючих остеогенез препаратів: вітаміну D₃ (аквадетрим, «Mediana Pharma», Польща) та остеогенону («Пьер Фабр», Франція) в поєднанні між

собою, а також з синтетичним гідроапатитом (синтекістка (СК)). Мононуклеари крові донорів та пацієнтів з ТЛК додавались до середовища RPMI-1640 («Serva», Німеччина) із вмістом глютаміну (290 мкг/мл) та ципринолу (40 мкг/мл, «КРКА», Словенія) до концентрації 2 млн/мл клітин. Застосовувались полістиролові пробірки («Spektar», Чехія), де в досліді до 1 мл середовища з клітинами крові додавали 0,1 мл розчину вітаміну D₃ (~50 МО) або 0,1 мл розчину остеогенону (100 мкг), або СК (50 мкг), або 2-3 препарати (мікст) одночасно. В контрольні пробірки з клітинами додавались 0,1 мл 0,9% розчину хлористого натрію. Всі дослідні та контрольні пробірки витримувались в CO₂-термостаті (E-160, Туреччина) протягом 18 годин, і далі центрифугувались в центрифугі з охолодженням NUVE-800R (Туреччина) при 4°C, збирався супернатант, в якому визначали рівні інтерлейкіну-1β та інтерлейкіну-10, γ-інтерферону, а також чинника регенерації – TGF-1β [3]. При роботі з культурами клітин *in vitro* дотримувались рекомендацій О.Ф. Мельникова та співавторів [7].

Друга частина експерименту була виконана на культурі клітин, де визначальним було виявлення мембрано-протективних властивостей зазначених остеотропних препаратів. Ця частина досліджень була репрезентована клітинами мезенхімального походження у вигляді перитонеальних тканинних базофілів щурів (ТБ), які отримувались при введенні в черевну порожнину тварин гемоцелю. Культура клітин ТБ в 0,5 мл середовища 199 оброблялась 0,1% розчином протамін сульфату, як це описано в роботі О.Ф. Мельникова та співавторів [6] протягом 30 хв, підфарбовувалась метиленовим синім і підраховувалась кількість клітин з явищами цейоза (хвилястість мембран) на 200 ТБ; в контролі замість декстрану додавався 0,1% розчин глюкози. Після цього добавлялись зазначені вище остеотропні препарати у вигляді монопрепарату та в комбінації між собою, інкубувались і знову підраховувалась кількість клітин з явищами цейоза мембран. Статистична обробка даних проводилась за допомогою критерію «U» Вілкоксона-Манна-Уїтні [2] та програми для комп'ютерної обробки WIN Perі.

Результати дослідження та їх аналіз

При дослідженні впливу препаратів на продукцію про- і протизапальних цитокінів (відповідно, інтерлейкінів 1β та 10) були отримані такі дані (рис. 1). Сам по собі препарат СК суттєво не впливав на рівні цитокінів у порівнянні із результатами культивування «без препарату». «Аквадетрім» та «Остеогенон» кожен окремо знижували рівень інтерлейкіну 1β і не впливали на рівень інтерлейкіну-10. Найбільш ефективними були комбінації препаратів і майже всі комбінації знижували рівень прозапального цитокіну та підвищували вміст в культуральній рідині протизапального інтерлейкіну-10.

Аналізуючи вихідні дані, слід підкреслити, що найбільший вплив на вміст цитокінів мали комбінації вітаміну D₃ (водорозчинна форма) та «Остеогенону». Ці дані можуть свідчити про те, що всі застосовані нами ремодуючі остеотропні засоби треба вводити в лікувальний процес поступово – спочатку місцево препарат СК, а потім «Остеогенон» у поєднанні з препаратом «Аквадетрім».

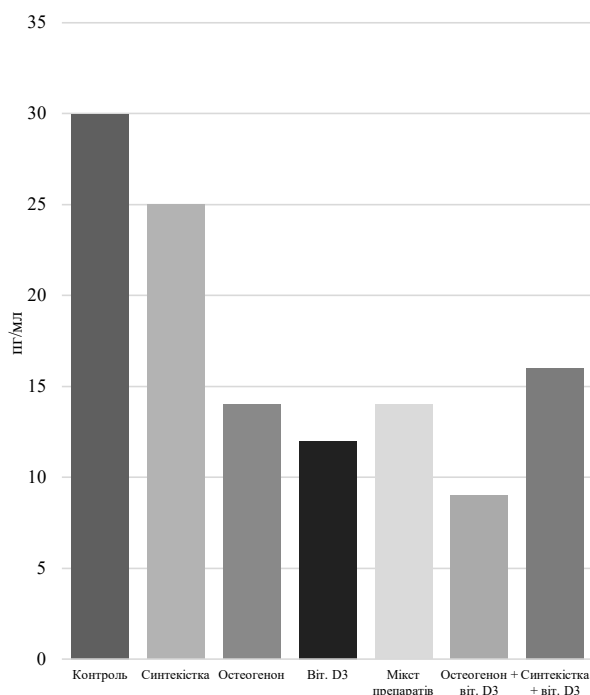


Рис. 1. Вміст інтерлейкіну-1β в культуральній рідині після впливу остеотропних препаратів окремо та в комбінаціях.

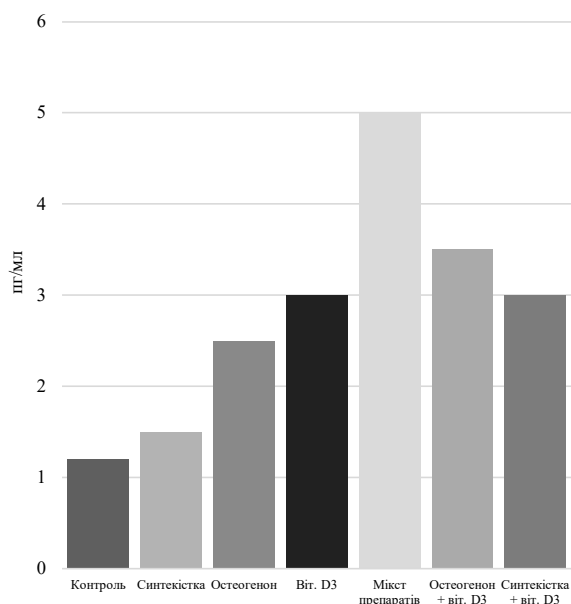


Рис. 2. Вміст інтерлейкіну-10 в культуральній рідині після впливу остеотропних препаратів окремо та в комбінаціях.

Продукти Th1-лімфоцитів-хелперів посідають одне з перших місць не тільки в антибактеріальному захисті, але і в регуляторних та відновлюючих процесах в організмі. Серед них роль γ -інтерферону є багатогранною, бо він виступає як антивірусний чинник та антагоніст проалергічного шляху розвитку імунної відповіді; як дуже важливий фактор активації механізмів вродженого імунітету, зокрема всіх фагоцитуючих та цитолітичних клітин [1, 3]. Виходячи зі сказаного, вектор змін в реакції клітин крові хворих на ТЛК на остеотропні препарати може бути вирішальним для оцінки доцільності використання окремих препаратів та їх комбінацій. Вміст інтерферону- γ в культуральній рідині репрезентовано у табл. 1. Вектор змін в продукції цього цитокину був направлений у бік збільшення продукції γ -інтерферону під дією всіх препаратів і їх мікстів, особливо з вітаміном D₃.

Таблиця 1

Вміст γ -інтерферону в культуральній рідині після культивування мононуклеарів крові хворих на ТЛК з остеотропними препаратами

Показники	Препарати						
	1 контроль (n=11)	2 синтекістка (n=11)	3 остеогенон (n=10)	4 вітамін D ₃ (n=11)	5 мікст (n=11)	6 остеогенон + вітамін D ₃ (n=11)	7 синтекістка + вітамін D ₃ (n=9)
М (пг/мл)	31,2	49,5	67,3	74,0	60,4	77,4	64,5
Мін.-макс.	24-47	39-57	45-70	37-85	36-70	50-84	50-71

Примітки: достовірність відмінностей між групами: $P_{1-2}<0,07$; $P_{1-3}<0,05$; $P_{1-4}<0,01$; $P_{1-5}>0,05$; $P_{1-6}<0,01$; $P_{1-7}<0,01$.

Відомо, що ростові фактори є показниками рівня репараційних процесів в організмі [3], і одним з найбільш активних є трансформуючий фактор росту (TGF-1 β), тому його рівень також було досліджено в культуральній рідині. З даних, представлених на рис. 3, випливає, що стимуляцію даного ростового чинника встановлено при дії всіх препаратів, а найбільша стимуляція була зафіксована при контакті з мікстом всіх препаратів (~1,7 мкг/мл).

Доведено, що стан мембран клітин різного гістогенезу має суттєве значення в процесах регенерації тканин і окремих клітинних популяцій [3]. Проведено спеціальні дослідження по визначенню мембранопротекторних властивостей у досліджуваних препаратах згідно рекомендацій О.Ф. Мельникова та співавторів [6]. Зниження відносної кількості ТБ з явищами цейозу (зміна конфігурації зовнішньої мембрани) є позитивним моментом в дії препарату і

може свідчити про його мембранопротекторну здатність (табл. 2). Протамін сульфат (лібератор) був здатен руйнувати 61% ТБ, а СК та «Остеогенон» знижували цей відсоток, але не достовірно. Достовірні дані отримані при дії вітаміну D₃ та комбінацій СК + вітамін D₃ і «Остеогенон» + вітамін D₃ (p=0,01).

Застосування загального міксту із всіх препаратів не відміняло ефекту ліберації ТБ. Можна припустити, що головним мембранопротектором виступає вітамін D₃ у вигляді водорозчинної форми – аквадетриму, який має різні напрямки патофізіологічного впливу на механізми запалення та регенерації [8].

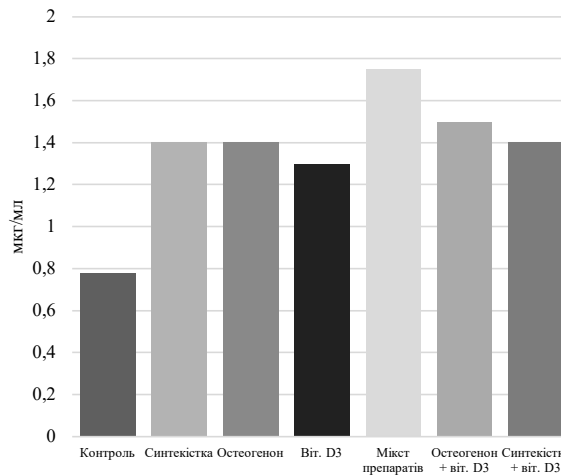


Рис. 3. Вміст ростового фактору TGF-1β в культуральній рідині після впливу остеотропних препаратів окремо та в комбінаціях.

Таблиця 2

Відносне число (%) клітин –ТБ з явищами цейозу мембрани (на 200)

Показники	Препарати						
	1 контроль (n=11)	2 синтектка (n=11)	3 остеогенон (n=10)	4 вітамін D ₃ (n=11)	5 Мікст-3 (n=11)	6 остеогенон + вітамін D ₃ (n=11)	7 синтектка + вітамін D ₃ (n=9)
М	61,2	49,2	47,3	40,0	60,4	27,4	34,4
Мін.-макс.	49-77	39-57	40-55	30- 50	36-80	20-34	30-41
Спонтанне руйнування:	8,5 (3-14)						

Примітки: достовірність відмінностей між групами: P₁₋₂<0,07; P₁₋₃<0,08; P₁₋₄<0,05; P₁₋₅>0,1; P₁₋₆<0,01; P₁₋₇<0,01.

Таким чином, в умовах експерименту було доведено, що остеотропні препарати різного походження можуть стимулювати продукцію мононуклеарми крові хворих на ТЛК про- та протизапальних цитокінів, фактору росту та регенерації, активувати Th1-лімфоцити-хелпери, а також можуть

виступати в ролі мембрано-протективних чинників: знижувати дію токсичних продуктів, які руйнують мембрани клітин. Всі ці результати дозволяють зробити висновок про доцільність комбінованого застосування досліджуваних остеотропних препаратів в комплексному лікуванні хворих з ТЛК.

Висновки

1. Найбільш ефективними в активації імункомпетентних клітин крові були комбінації остеотропних препаратів, які знижували рівень прозапального цитокіну та підвищували вміст в культуральній рідині протизапального інтерлейкіну-10.

2. Найбільша стимуляція ростового чинника зафіксована при контакті з мікстом із всіх препаратів (~1,7 мкг/мл) в комбінації з вітаміном D₃.

3. Мембранопротективні властивості ефективні при дії вітаміну D₃ та комбінацій

СК + вітамін D₃ і остеогенон + вітамін D₃ (p=0,01) на тканинні базофіли при дії лібератора протамін-сульфату.

4. Застосування загального міксту зі всіх препаратів не відміняло ефекту лібератції ТБ.

Література

1. Abaturon OE, Kryuchko TO, Agafonova OO, Dityatkovsky VO. [Pathogenetic bases of development and possibilities of medical correction of the infectious process in paediatric practice]. Kyiv: Julia print; 2016. 103 p. [In Ukrainian].
2. Gerasimov AH. [Medical statistics]. Moscow: Medicine; 2007. 176 p. [In Russian].
3. Drannik GN. [Clinical immunology and allergology]. Kyiv: Poligraf plus; 2010. 552 p. [In Russian].
4. Kaidashev IP, editor. [Methods of clinical and experimental research in medicine]. Poltava: Polymet; 2003. 320 p. [In Ukrainian].
5. Lisianyi NI. The dual role of the immune system in the pathogenesis of traumatic brain injury. Ukrainian Neurosurgical Journal. 2019;25(1):5-11.
6. Melnikov OF, Zabolotny DI, Malyarenko TV, Prilutskaya OD. [Rhinitis in the rational pharmacotherapy of seasonal allergic rhinitis]. Kyiv: Vistka; 2015. 167 p. [In Ukrainian].
7. Melnikov OF, Timchenko MD, Timchenko SV, Krasii RI. [Experimental studies on the effect of Imupret and Sinupret on key immunity parameters]. Zhurnal ushnyh, nosovyh i gorlovyh boleznej. 2010;(5):55-9. [Article in Russian].
8. Snopov SA. [Mechanisms of action of vitamin D on the immune system]. Medical Immunology (Russia). 2014;16(6):499-530. [Article in Russian].
9. Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. JAMA Neurol. 2015 Mar;72(3):355-62. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.3558.
10. Gadani SP, Walsh JT, Lukens JR, Kipnis J. Dealing with Danger in the CNS: The Response of the Immune System to Injury. Neuron. 2015 Jul;87(1):47-62. doi: 10.1016/j.neuron.2015.05.019.
11. Bondarchuk AD, Melnykov OF, Timchenko MD, Didyk ND. [Clinical and immunological studies of humoral factors of inflammation and regeneration in patients with injuries of the frontal and basal area]. Otorhinolaryngology. 2021;4(4):68-71. doi: 10.37219/2528-8253-2021-4-68. [Article in Ukrainian].
12. Woodcock T, Morganti-Kossmann MC. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. Front Neurol. 2013 Mar;4:18. doi: 10.3389/fneur.2013.00018.

Надійшла до редакції 09.02.2023

© О.Д. Бондарчук, О.Ф. Мельников, М.Д. Тимченко, Н.Д. Дідик, 2023

ПАТОФІЗІОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ МЕХАНІЗМІВ ДІЇ ОСТЕОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ В ЕКСПЕРИМЕНТІ IN VITRO НА МОНОНУКЛЕАРИ КРОВІ ХВОРИХ ІЗ ТРАВМАМИ ЛОБНОЇ КІСТКИ

^{1,2}Бондарчук ОД, ³Мельников ОФ, ³Тимченко МД, ²Дідик НД

¹Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова;

²Вінницька обласна клінічна лікарня ім. М.І. Пирогова;

³Державна установа «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка Національної академії медичних наук України»

А н о т а ц і я

Актуальність: Патогенетичне лікування травм голови повинні базуватися з врахуванням розвитку посттравматичної хвороби, в тому числі і ролі імунних реакцій в процесах регенерації кісткового матриксу. Репарація структур кісток залежить від активуючих стимулів з боку клітин імунної системи. На сьогодні є дослідження про значення вітаміну D в метаболічних процесах в мезенхімальній тканині, які впливають на формування кісткового матриксу і загальну мінералізацію кісток, також препарат остеогенон,

основною якого є осейно-гідроксиапатитові сполуки, які стимулюють локальні регулятори ремоделювання кісткової тканини та кальцієво-фосфорного обміну. Враховуючи ці дані, доцільним буде визначити вплив препаратів на процеси регенерації кісткової тканини у хворих з травмами лобної кістки.

Мета: визначити вплив різних препаратів, що застосовуються при лікуванні фронтальних травм черепа, на патофізіологічні механізми запалення (інтерлейкін-1 β , інтерлейкін-10, γ -інтерферон), стабілізацію мембран клітин, рівень регенераторних цитокінів.

Матеріали і методи: Авторами проведено імунологічні дослідження з визначення цитокінових факторів запалення та регенерації у 29 хворих з травмою лобової кістки (ТЛК) під дією різних остеотропних препаратів: синтекістка (СК), остеогенон (ОГ) та вітамін D₃ (водорозчинна форма – аквадетрім), як окремо, так і в комбінаціях між собою. Дослідження проводились в експерименті *in vitro* в середовищі Rpmi-1640 («Серва», Німеччина) з моноклеарами крові від хворих. γ -інтерферон), протизапальний фактор регенерації (трансформуючий фактор росту-TGF-1 β). В умовах експерименту на культурах перитонеальних тканинних базофілів досліджували мембранопротективні властивості зазначених вище остеотропних препаратів в умовах використання як ушкоджуючого фактора протамін-сульфату.

Результати та обговорення: встановлено, що у хворих з травмами лобної пазухи остеогенон та аквадетрим (віт. D₃) позитивно впливають на продукцію цитокінів моноклеарами крові хворих з ТЛК: знижують рівень продукції *in vitro* прозапальних та підвищують продукцію протизапальних цитокінів, особливо при спільному застосуванні. Протамін сульфат (лібератор) був здатний руйнувати 61% тканинних базофілів, СК та остеогенон знижували цей відсоток, але не достовірно. Достовірні дані отримані при дії вітаміну, та комбінацій СК + вітамін і остеогенон + вітамін ($p=0,01$). Застосування загального міксту зі всіх препаратів не відміняло ефекту ліберації тканинних базофілів. Можна припустити, що головним мембранопротектором виступає вітамін D₃ у вигляді водорозчинної форми – аквадетриму, яка має різні напрямки патофізіологічного впливу на механізми запалення та регенерації.

Висновки: Ростовий чинник краще стимулювався при застосуванні міксту зі всіх препаратів (~1,7 мкг/мл) в комбінації з вітаміном D₃. Мембранопротективні властивості були краще виражені при дії вітаміну D₃ та комбінацій синтекістка + вітамін D₃ і остеогенон + вітамін D₃. Найбільш ефективними в активації імунокомпетентних клітин крові були комбінації остеотропних препаратів, які знижували рівень прозапального цитокіну та підвищували вміст в культуральній рідині протизапального інтерлейкіну-10.

Ключові слова: остеогенон, вітаміну D₃, фронто-базальної травма, моноклеари, інтерлейкин 10, γ -інтерферон, інтерлейкін-4, трансформуючий фактор росту TGF-1 β .

PATHOPHYSIOLOGICAL ASPECTS OF THE MECHANISMS OF ACTION OF OSTEOTROPIC DRUGS IN AN IN VITRO EXPERIMENT ON THE BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF PATIENTS WITH FRONTAL BONE INJURIES

^{1,2}Bondarchuk AD, ³Melnykov OF, ³Timchenko MD, ²Didyk ND

National Pirogov Memorial Medical University;

Mykola Pyrohov Vinnytsia Regional Hospital;

State Institution «O.S. Kolomiychenko Institute of otolaryngology of National academy of medical sciences of Ukraine»

Email: esculap20009@gmail.com

Abstract

Relevance: Pathogenetic treatment of head injuries should be based on the development of post-traumatic disease, including the role of immune reactions in bone matrix regeneration processes. Repair of bone structures depends on activating stimuli from cells of the immune system. Currently, there is research on the importance of vitamin D in metabolic processes in mesenchymal tissue that affect the formation of the bone matrix and general mineralization of bones, as well as the drug osteogenon, the basis of which are ossein-hydroxyapatite compounds, which stimulate local regulators of bone tissue remodelling and calcium-phosphorus metabolism. Taking into account these data, it will be appropriate to determine the effect of drugs on the processes of bone tissue regeneration in patients with injuries of the frontal bone.

Purpose: to determine the effect of various drugs used in the treatment of frontal skull injuries on the pathophysiological mechanisms of inflammation (interleukin-1 β , interleukin-10, γ -interferon), stabilization of cell membranes, and the level of regenerative cytokines.

Materials and methods: The authors conducted immunological studies on the determination of cytokine factors of inflammation and regeneration in 29 patients with frontal bone injury under the influence of various osteotropic drugs: ossein-hydroxyapatite compounds, osteogenon and vitamin D₃ (water-soluble form –

aquadetrim), both individually and in combination with each other. The research was carried out in an in vitro experiment in RPMI-1640 medium (Serva, Germany) with blood mononuclear cells from patients. γ -interferon), anti-inflammatory regeneration factor (transforming growth factor-TGF-1 β). In the conditions of the experiment, the membrane-protective properties of the above-mentioned osteotropic drugs were investigated on cultures of peritoneal tissue basophils under the conditions of using protamine sulfate as a damaging factor.

Results and discussion: it was established that osteogenon and aquadetrim (vit. D₃) have a positive effect on the production of cytokines by mononuclear cells in the blood of patients with TLC: they reduce the level of in vitro pro-inflammatory production and increase the production of anti-inflammatory cytokines, especially when used together. Protamine sulphate (liberator) was able to destroy 61% of tissue basophils, SK and osteogenon reduced this percentage, but not reliably. Reliable data were obtained under the action of vitamin, and combinations of ossein-hydroxyapatite compounds + vitamin and osteogenon + vitamin ($p=0.01$). The use of a general mixture of all drugs did not cancel the effect of liberation of TB. It can be assumed that the main membrane protector is vitamin D₃ in the form of a water-soluble form – aquadetrim, which has various directions of pathophysiological influence on the mechanisms of inflammation and regeneration.

Conclusions: The growth factor was better stimulated with a mixture of all drugs ($\sim 1.7 \mu\text{g/ml}$) in combination with vitamin D₃. Membrane-protective properties were better expressed under the action of vitamin D₃ and combinations of ossein-hydroxyapatite compounds + vitamin D₃ and osteogenon + vitamin D₃. The most effective in activating immunocompetent blood cells were combinations of osteotropic drugs that reduced the level of pro-inflammatory cytokines and increased the content of anti-inflammatory interleukin-10 in the culture fluid.

Key words: fronto-basal trauma, mononuclear cells, osteogenon, vitamin D₃, interleukin 10, γ -interferon, interleukin-4, transforming growth factor TGF-1 β .