

*О.Ф. МЕЛЬНИКОВ, Ю.В. МІНІН, М.Д. ТИМЧЕНКО,
Т.І. КУЧЕРЕНКО, Г.Ю. МІНІНА*

ВМІСТ ТРАНСФОРМУЮЧОГО ФАКТОРА РОСТУ TGF- β 1 ТА ІНТЕРЛЕЙКІНУ-6 В СИРОВАТЦІ КРОВІ КРОЛІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ ТРАВМОЮ ВУШНОЇ РАКОВИНИ ПІСЛЯ СИСТЕМНОГО ЗАСТОСУВАННЯ АЛОГЕННИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН МЕЗЕНХІМАЛЬНОГО ПОХОДЖЕННЯ

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

Застосування стовбурових клітин (СК) в реконструктивно-відновлювальній хірургії, зокрема, при пошкодженні хрящів, вважається перспективним і конче необхідним направленням. Адже зрілі хондроцити мають знижений потенціал поділу, ймовірно, це пов'язано зі скудною васкуляризацією хряща і наявністю щільного, малопроникного для біологічно активних речовин (БАР) та клітин матриксу. В результаті природна репарація дефектів хрящової тканини, зокрема, вуха та крил носа, відбувається шляхом фіброплазії, а не регенерації [1].

Одним з перспективних напрямків підвищення можливості відновлення тканин, зокрема хрящової, є використання стовбурових клітин. Серед них у клінічній практиці частіше застосовуються клітини мезенхімального походження (МСК), які здатні до самовідновлення і диференціації в клітини дорослого організму [2-4].

Саме тому ряд досліджень зосереджено на стовбурових клітинах мезенхімального походження (МСК), які *in vitro* демонструють адипогенний, остеогенний, хондрогенний, міогенний та нейрогенний потенціали [5]. На даний момент стовбурові клітини найчастіше використовуються як складова частина тканинно-інженерних конструкцій, коли ними заселяють полімерні каркаси з хорошою біосумісністю та зда-

тністю біорозкладатися [6]. Повідомляється [7], що тканинна інженерія може бути використана для відновлення трахеї, вухної раковини, а в деяких пацієнтів вдалося успішно відновити дефекти крил носа за допомогою такої стратегії. При моделюванні травми зовнішнього вуха у кролика описано репарацію тканин вухної раковини під впливом МСК. Повної регенерації хряща не отримано [8-10].

Сигнали, що поступають від МСК в організмі реципієнта, також, як і сигнали клітин господаря, спрямовані на імплантовані клітини, різноманітні і створюють непросту матрицю взаємовідносин. В дослідженнях *in vitro* показано, що стовбурові клітини модулюють відповіді В- та Т-лімфоцитів. МСК можуть фактично підтримувати запалення за допомогою підвищення кількості Th-17, модуляції кількості Т-хелперів 1 (Th1) та природних клітин-кілерів (NK). Але запальне середовище, в свою чергу, знижує здатність МСК до імуносупресії [11]. Імунна регуляція може здійснюватися стовбуровими клітинами також через опосередкований вплив на дендритні клітини шляхом зниження ними продукції прозапальних фактора некрозу пухлин-альфа (TNF α) і гамма-інтерферону (IFN γ), а також збільшення продукції інтерлейкіну-10 (IL-10). Тобто, при застосуванні

МСК можуть реалізовуватися вельми суперечливі впливи, які можна оцінити як такі, що сприяють запаленню, так і протизапальні [12-15]. В деяких дослідженнях навіть виділяють прозапальний фенотип МСК1 та імуносупресивний МСК2 [16].

Останнім часом значна увага приділяється підвищенню ефективності використання МСК за рахунок їх прекодиціонування з різними факторами (ліпополісахаридами, перекис водню, гамма-інтерферон, вплив гіпоксії тощо), що сприяє отриманню ними властивостей про- або антизапальних та стимулює секрецію стовбуровими клітинами необхідних цитокінів.

Найбільш вивченими регуляторними факторами, що безпосередньо беруть участь у хондрогенезі, є родина білків трансформуючого фактора росту бета (TGF- β) і споріднені йому фактори росту кісткової тканини (BMP), фактори росту фібробластів (FGF), інсуліноподібні фактори росту (IGF) [17,18]. Активація гену TGF- β 1 відбувається у відповідь на пошкодження тканин. Його функції спрямовані на стимуляцію проліферації та активності фібробластів, пригнічення продукції інших типів клітин, диференціювання, рухливості та апоптозу деяких клітин, що може призводити до імуносупресивної дії, формуванню позаклітинного матриксу (ПКМ) і в результаті – загоюванню ран [19-21]. Зокрема, цей цитокін регулює експресію генів, що кодують колагени [22, 23]. Білки родини TGF- β , створені організмом реципієнта, призводять до прискореного диференціювання клітин [24, 25]. Але і на донорських МСК експресія TGF- β 1 також значно збільшена, відповідно, і трансплантовані стовбурові клітини також безпосередньо сприяють подальшому диференціюванню хондробластів реципієнта [26]. Загалом механізми імуномодуляції, контрольовані TGF- β , на даний момент їх вивчення, визнаються складними та неоднозначними за спрямованістю ефектів [27].

IL-6 також бере участь у регуляції хондрогенезу, маючи чисельні біологічні функції, але в основному прозапального характеру. Основними проявами біологічної активності IL-6 є модуляція взаємодії Т- і В-лімфоцитів, підсилення функціональної активності Т-кілерів; стимуляція гранулоцита-

рного паростка кровотворення. Прозапальна дія IL-6 проявляється також активацією експресії молекул адгезії на ендотелії та посиленням хемотаксису лейкоцитів [36]. Вважається, що цей цитокін рятує МСК від апоптозу та інгібує їх хондрогенне диференціювання. Таким чином, IL-6 підтримує проліферативний та недиференційований стан деякої кількості МСК у тканинах (експериментально це доведено для стовбурових клітин кістково-мозкового походження) [18].

У дослідженні з вивчення регенерації хряща при остеоартрозі було доведено, що регулювання прозапальних та протизапальних цитокінів та інших факторів та підтримання їх балансу під час лікування є ефективною стратегією [29]. Ймовірно, визначення та оптимальне підтримання балансу між прозапальними та протизапальними факторами забезпечить новий підхід до лікування станів, пов'язаних із пошкодженням хряща [6], і при отоларингологічних проблемах також. Це цілком перспективно з погляду майбутнього клінічного застосування, оскільки підвищення регенеративної здатності МСК таким шляхом може бути досягнуто і без потенційно шкідливих модифікацій МСК [30].

Метою роботи було вивчення динаміки змін прозапальних та регенераторних цитокінів після системного використання нативних та прекодиційованих МСК.

Матеріали та методи

Вміст інтерлейкіну-6 та трансформуючого фактора росту TGF- β 1 вивчався в сироватці крові дослідної та контрольної груп кролів методом імуноферментного аналізу (ІФА).

Сироватку отримували з венозної крові лабораторних кролів шляхом центрифугування протягом 15 хв при обертовій частоті 1500 об/хв (300 g). Зразки сироватки до початку проведення аналізу зберігались при температурі мінус 25 °С. Для ІФА використовувались реактиви Elabscience Biotechnology Inc. (USA): RabbitIL-6 (Interleukin 6) ELISAKit та Rabbit TGF- β 1 (Transforming Growth Factor Beta 1) ELISAKit згідно рекомендацій виробника. Вимірювання оптичної щільності проводилось на планшетному спектрофотометрі Stat Fax (USA).

Експериментальне пошкодження хряща вушної раковини кролів проводили під загальним знеболюванням. Всім тваринам хірургічні втручання були виконані під загальною анестезією комбінацією препаратів (дексмедетомідин 0,25 мг/кг + кетамін 35 мг/кг згідно рекомендацій ULAM Rabbit Anesthesia and Analgesia Guidelines [31]. Препарати для загальної анестезії змішувались в одному шприці і вводились внутрішньом'язово, однократно. Зазначена комбінація препаратів дозволяла досягти адекватного рівня знеболення, що був достатнім для виконання експериментальних операцій. Ускладнень, пов'язаних з наркозом, не спостерігалось. Необхідний рівень седативного ефекту наступав через 15 хв. на фоні м'язової релаксації.

У кожної тварини після попереднього видалення вовняного покриву у проксимальній ділянці, тобто ближче до основи вуха, на тильній його поверхні виконувався розтин шкіри та охрястя. Останні відсепаровувались від хряща на площі до 1,5 см², після чого видалявся фрагмент хрящової пластини розміром 1,0х0,5 см. Після експериментальної травми вушної раковини, кролів (44 дорослих тварин породи «сірий велетень») було розподілено на дві групи – контрольну (14 тварин) та експериментальну (30 тварин). Тварин експериментальної групи, в свою чергу, було розподілено на дві підгрупи. Кожній тварині 1-ї підгрупи (16 тварин) одноразово внутрішньовенно вводили 5 млн. нативних алогенних МСК, 2-ї підгрупи (14 тварин) – по 5 млн. прекодиційованих алогенних МСК.

Для прекодиціювання мезенхімальні стовбурові клітини після першого пасажу висівали на флакони 75 см² у кількості 4 млн. Через 1 добу культивування в експериментальній групі поживне середовище замінювали на таке, що містило 20 мМ перекису водню. МСК культивували 12 годин, після чого пасували. При пасуванні було відібрано 50 млн МСК в кожній групі, центрифуговано, відмито фізіологічним розчином, і розподілено на дози (5 млн) для введення дослідним тваринам.

Експериментальні роботи проводились згідно заходів забезпечення бережливого та гуманного поводження з тваринами

у відповідності до установ Конвенції Ради Європи про положення біомедицини та Законів України.

Статистичні та аналітичні методи застосовувались відповідно сучасним вимогам медико-біологічних досліджень. При проведенні статистичних розрахунків використовувався пакет програмного забезпечення відкритого доступу для біометричних досліджень Win PEPI. Достовірність розбіжностей отриманих даних визначалась за допомогою однобічного непараметричного критерію «U» – Манна-Уїтні. Порівнювались показники груп тварин на різних строках після моделювання дефекту з подальшою експериментальною терапією з відповідними за часом групами, що не отримували лікування після моделювання травми. Отримані дані порівнювали з показниками контрольної групи (К), оцінюючи достовірність розбіжностей за критерієм «U». Дані представлено у вигляді значень середнього арифметичного (М), медіани (Me), квартилей (Q25-Q75), при недостатній для обчислення квартилей кількості досліджень (n=3) вказано межі коливань (МК). Кількість проведених досліджень позначалась як n. Відмінності вважались статистично вірогідними при $p_U < 0,05$.

Результати та обговорення

Вміст досліджуваних цитокінів визначався в динаміці спостереження, протягом 3 місяців після експериментальної травми. Результати експериментальних досліджень наведено у табл. 1-4. Групи порівняння дослідних та контрольних тварин позначалися відповідно як 1-3 та 1К-3К згідно термінам спостереження (1-3 місяці після моделювання травми).

Виявлено статистично вірогідне ($p_U < 0,05$) зменшення кількості TGF- β 1 у тварин через 3 місяці після моделювання травми і введення нативних МСК порівняно з контролем. При порівнянні результатів дослідної та контрольної групи, отриманих на інших строках після пошкодження хряща вуха, не виявлено статистично достовірних розбіжностей. Також не визначається достовірність змін вмісту TGF- β 1 при порівнянні результатів дослідної та контрольної груп в динаміці спостережень.

Таблиця 1

Зміни вмісту TGF- β 1 у крові кролів з дефектом хряща в різні строки
після системного введення нативних МСК

Групи тварин	Статистичні показники	Вміст TGF- β 1, пкг/мл		
		Терміни дослідження, місяці		
		1	2	3
1-а підгрупа дослідної групи (дефект хряща та введення нативних МСК)	n	5	3	8
	M	41,30	36,37	70,42
	Me	26,90	21,10	42,25
	Q25-Q75	0-89,80	0-88,0*	7,00-162,00
Контрольна група (дефект хряща без введення МСК)	n	5	не визначалося	3
	M	134,72	не визначалося	244,13
	Me	0	не визначалося	250,10
	Q25-Q75	0-336,80	не визначалося	89,0-393,3*
Достовірність розбіжностей	$p_{U\ 3/3K} < 0,05$			

Примітки:

1 – $p_{U\ 3/3K}$ – достовірність розбіжностей між показниками дослідної та контрольної груп через 3 місяці спостережень;

2 – при порівнянні між собою дослідної та контрольної груп на інших строках після моделювання травми $p_U > 0,10$ в усіх випадках;

3 – * - МК.

Таблиця 2

Зміни вмісту IL-6 у крові кролів з дефектом хряща та в різні строки
після внутрішньовенного введення нативних МСК

Групи тварин	Статистичні показники	Вміст IL-6, пкг/мл		
		Терміни дослідження, місяців		
		1	2	3
1-а підгрупа дослідної групи (дефект хряща та введення нативних МСК)	n	5	3	8
	M	1,19	1,70	4,8
	Me	5,1	2,40	2,30
	Q25-Q75	2,3-293,6	0,2-2,5*	0 – 18,8
Контрольна група (дефект хряща без введення МСК)	n	5	6	3
	M	4,64	19,92	38,10
	Me	0,70	2,05	32,40
	Q25-Q75	0-11,25	0,10-47,90	30,9-51,0*
Достовірність розбіжностей	$p_{U\ 1K/3K} < 0,05$ $p_{U\ 3/3K} < 0,05$			

Примітки:

1 – $p_{U\ 1K/3K}$ – достовірність розбіжностей між показниками контрольної групи через 1 місяць після травми та через 3 місяці спостережень;

2 – $p_{U\ 3/3K}$ – достовірність розбіжностей між показниками дослідної та контрольної груп через 3 місяці спостережень;

3 – при порівнянні між собою дослідної та контрольної груп в інші терміни після моделювання травми $p_U > 0,10$ в усіх випадках;

4 – * - МК.

Визначається статистично вірогідне ($p_U < 0,05$) зменшення кількості ІЛ-6 у тварин через 3 місяці після експериментальної травми і введення нативних МСК при порівнянні з контрольною групою. При порівнянні результатів дослідної та контрольної груп на інших строках після травми не виявлено статистично достовірних розбіжностей. Виявлено статистично вірогідне збільшення вмісту ІЛ-6 в сироватці крові контрольних тварин через 3 місяці спостережень порівняно з результатами, що отримано через 1 місяць після травми.

Кількість TGF- β 1 достовірно зменшується через 3 місяці після травми у тварин, які отримали експериментальне лікування прекондиційованими МСК, порівняно з контролем на такому ж терміні спостереження. При порівнянні результатів дослідної та контрольної групи на інших строках спостереження не виявлено статистично достовірних розбіжностей.

У тварин дослідної групи, що отримували прекондиційовані МСК після моделювання травми, кількість ІЛ-6 в сироватці

крові зменшується через 3 місяці після моделювання травми: виявляються вірогідні розбіжності порівняно з результатами як першого, так і другого місяця спостережень. Спостерігається статистично достовірне зменшення кількості ІЛ-6 через 3 місяці після травми у тварин дослідної групи порівняно з результатами контрольної групи на тому ж строку спостереження.

Імунологічні та патофізіологічні аспекти терапії алогенними стовбуровими клітинами можна розглядати з декількох сторін. Зокрема, на трансплантовані СК системно або місцево діють цитокіни та інші БАР реципієнта, в той же час трансплантовані СК самі продукують ряд БАР. Крім того, у більшості експериментальних моделей стовбурові клітини перед трансплантацією піддаються впливу «коктейлю» з БАР *in vitro*, з метою виявити їх хондрогенний потенціал і задати поліпотентним стовбуровим клітинам бажаний напрямок диференціації (наприклад, застосовуються «хондрогенні» чи «остеогенні» середовища для культивування).

Таблиця 3

Зміни вмісту TGF- β 1 у крові кролів з дефектом хряща та в різні строки після внутрішньовенного введення прекондиційованих МСК

Групи тварин	Статистичні показники	Вміст TGF- β 1, пкг/мл		
		Терміни дослідження, місяців		
		1	2	3
2-а підгрупа дослідної групи (дефект хряща та введення прекондиційованих МСК)	n	5	5	4
	M	35,38	29,82	28,68
	Me	33,70	23,20	11,60
	Q25-Q75	10,5-72,0	0-67,5	0-9,5
Контрольна група (дефект хряща без введення МСК)	n	3	не визначалося	3
	M	134,72	не визначалося	244,13
	Me	0	не визначалося	250,10
	Q25-Q75	0-336,80	не визначалося	89,0-393,3*
Достовірність розбіжностей	$p_{U/3K} < 0,05$			

Примітки:

1 – $p_{U/3K}$ – достовірність розбіжностей між показниками дослідної та контрольної груп через 3 місяці спостережень;

2 – при порівнянні між собою дослідної та контрольної груп в інші терміни після моделювання травми $p_U > 0,10$ в усіх випадках;

3 – * – МК.

Таблиця 4

Зміни вмісту ІЛ-6 у крові кролів з дефектом хряща та в різні строки після внутрішньовенного введення прекондиційованих МСК

Групи тварин	Статистичні показники	Вміст ІЛ-6, пкг/мл		
		Терміни дослідження, місяців		
		1	2	3
2-а підгрупа дослідної групи (дефект хряща та введення прекондиційованих МСК)	n	5	5	4
	M	1,5	2,6	0,2
	Me	1,3	2,8	0,15
	Q25-Q75	0,2-3,3	1,3-4,2	0-0,5
Контрольна група (дефект хряща без введення МСК)	n	5	6	3
	M	4,64	19,92	38,10
	Me	0,70	2,05	32,40
	Q25-Q75	0-11,25	0,10-47,90	30,9-51,0*
Достовірність розбіжностей	$p_{U 1/3} < 0,05$ $p_{U 2/3} < 0,01$ $p_{U 3/3K} < 0,05$			

Примітки:

1 – $p_{U 1/3}$ – достовірність розбіжностей між показниками дослідної групи через 1 та 3 місяці після моделювання травми і введення прекондиційованих МСК;

2 – $p_{U 2/3}$ – достовірність розбіжностей між показниками дослідної групи через 2 та 3 місяці спостережень;

3 – $p_{U 3/3K}$ – достовірність розбіжностей між показниками дослідної та контрольної груп через 3 місяці спостережень;

4 – при порівнянні між собою результатів, отриманих в дослідній та контрольній групах на інших строках спостереження $p_U > 0,10$ в усіх випадках;

5 – * – МК.

Не завжди зрозуміло, чи то донорські МСК розмножуються і диференціюються в хондроцити в місці травми, чи трансплантовані МСК, секретиючи цитокіни, діють як «організатори» та сприяють регенерації, стимулюючи клітини реципієнта (наприклад, вже присутні в зоні ураження хондробласти). Або, можливо, що цитокіновий вплив донорських МСК сприяє міграції аутологічних СК в зону травми.

За будь-якого підходу до моделювання процесів регенерації еластичного хряща підкреслюється важливість впливу гуморальних сигналів на клітини, задіяні в репарації. Це може бути як системний вплив цитокінів, так і сукупність факторів мікрооточення безпосередньо в області травми, що діють паракринно та аутокринно [11, 12]. Особливістю алогенних СК є здатність уникати імунологічного конфлікту при трансплантації, вислизаючи від нагляду (завдяки

відсутності антигенів комплексу гістосумісності II типу) та активно модифікуючи тригерні та ефекторні функції вродженого і адаптивного імунітету. Тим самим СК здійснюють широкомасштабний, переважно супресивний вплив на клітинні взаємовідносини [13, 14].

Висновки

Аналізуючи отримані в експериментальних дослідженнях дані, можна, на наш погляд, зробити такі узагальнюючі висновки.

1. Системне застосування МСК супроводжується змінами цитокінового профілю, зокрема, вмісту TGF- β 1 та ІЛ-6.

2. В нашому дослідженні не виявлено суттєвих розбіжностей у вмісті TGF- β 1 та ІЛ-6 в сироватці крові експериментальних тварин при застосуванні нативних і прекондиційованих алогенних МСК.

1. Itokazu M, Wakitani S, Mera H, Tamamura Y, Sato Y, Takagi M, Nakamura H. Transplantation of scaffold-free cartilage-like cell-sheets made from human bone marrow mesenchymal stem cells for cartilage repair: a preclinical study. *Cartilage*. 2016 Oct;7(4):361-72. doi: 10.1177/1947603515627342.
2. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song G. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells*. 2019 Jul 28;8(8):784. doi: 10.3390/cells8080784.
3. Hu C, Li L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med*. 2018 Mar;22(3):1428-1442. doi: 10.1111/jcmm.13492.
4. Liu S, Liu F, Zhou Y, Jin B, Sun Q, Guo S. Immunosuppressive Property of MSCs Mediated by Cell Surface Receptors. *Front Immunol*. 2020;11:1076. doi: 10.3389/fimmu.2020.01076.
5. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and literature review. *J Nippon Med Sch*. 2009 Apr;76(2):56-66. doi: 10.1272/jnms.76.56.
6. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7:33-42. doi: 10.1038/nrrheum.2010.196.
7. Huang BJ, Hu JC, Athanasiou KA. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. *Biomaterials*. 2016;98:1-22. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.04.018.
8. Cheng Y, Cheng P, Xue F, Wu K-m, Jiang M-j, Ji J-f, et al. Repair of ear cartilage defects with allogenic bone marrow mesenchymal stem cells in rabbits. *Cell Biochem Biophys*. 2014 Nov;70(2):1137-43. doi: 10.1007/s12013-014-0033-2.
9. Bielli A, Scioli MG, Gentile P, Cervelli V, Orlandi A. Adipose-derived stem cells in cartilage regeneration: current perspectives. *Regen Med*. 2016 Oct;11(7):693-703. doi: 10.2217/rme-2016-0077.
10. Bahrani H, Razmkhah M, Ashraf MJ, Tanideh N, Chenari N, Khademi B, Ghaderi A. Differentiation of adipose-derived stem cells into ear auricle cartilage in rabbits. *J Laryngol Otol*. 2012 Aug;126(8):770-4. doi: 10.1017/S0022215112001065.
11. Sullivan CB, Porter RM, Evans CH, Ritter T, Shaw G, Barry F, Murphy JM. TNF α and IL-1 β influence the differentiation and migration of murine MSCs independently of the NF- κ B pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2014 Aug 27;5(4):104. doi: 10.1186/scrt492.
12. Richardson SM, Mobasheri A, Freemont AJ, Hoyland JA. Intervertebral disc biology, degeneration and novel tissue engineering and regenerative medicine therapies. *Histol Histopathol*. 2007 Sep;22(9):1033-41. doi: 10.14670/HH-22.1033.
13. Hashizume H. Three-dimensional architecture and development of lumbar intervertebral discs. *Acta Med Okayama*. 1980 Nov;34(5):301-14. doi: 10.18926/AMO/30545.
14. Norcross JP, Lester GE, Weinhold P, Dahners LE. An in vivo model of degenerative disc disease. *J Orthop Res*. 2003;21:183-8. doi: 10.1016/S0736-0266(02)00098-0.
15. Ren C, Song Y, Xue Y, Yang X. Mid- to long-term outcomes after cervical disc arthroplasty compared with anterior discectomy and fusion: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur Spine J*. 2014;23:1115-23. doi: 10.1007/s00586-014-3220-3.
16. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010 Apr 26;5(4):e10088. doi: 10.1371/journal.pone.0010088.
17. Tuan S, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(1):32-45. doi: 10.1186/ar614.
18. Danišovič L, Varga I, Polák S. Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue Cell*. 2012 Apr;44(2):69-73. doi: 10.1016/j.tice.2011.11.005.
19. Ketlinsky SA, Simbirtsev AS. [Cytokines]. *St. Petersburg: Foliant*; 2008. 552 p. [In Russian].
20. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:597-641. doi: 10.1146/annurev.cb.06.110190.003121.
21. Lee BS, Nowak RA. Human leiomyoma smooth muscle cells show increased expression of transforming growth factor-beta 3 (TGF beta 3) and altered responses to the antiproliferative effects of TGF beta. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Feb;86(2):913-20. doi: 10.1210/jcem.86.2.7237.
22. Pricola KL, Kuhn NZ, Haleem-Smith H, Song Y, Tuan RS. Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. *J Cell Biochem*. 2009 Oct 15;108(3):577-88. doi: 10.1002/jcb.22289.
23. Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH. Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett*. 2002 Jun 3;82(1-2):85-91. doi: 10.1016/s0165-2478(02)00023-8.
24. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*. 2001 Aug 15;268(2):189-200. doi: 10.1006/excr.2001.5278.

25. Mueller MB, Fischer M, Zellner J, Berner A, Dienstknecht T, Prantl L, et al. Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF- β isoforms and chondrogenic conditioning. *Cells Tissues Organs*. 2010;192(3):158-66. doi: 10.1159/000313399.
26. Kang SW, Do HJ, Han IB, Shin DA, Kim HO, Kim JH, Lee S-H. Increase of chondrogenic potentials in adipose-derived stromal cells by co-delivery of type I and type II TGF β receptors encoding bicistronic vector system. *J Control Release*. 2012 Jun 28;160(3):577-82. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.04.011.
27. Town T, Laouar Y, Pittenger C, Mori T, Szekeley CA, Tan J, et al. Blocking TGF- β -Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology. *Nat Med*. 2008 Jun;14(6):681-7. doi: 10.1038/nm1781.
28. Attur MG, Patel RN, Abramson SB, Amin AR. Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum*. 1997 Jun;40(6):1050-3. doi: 10.1002/art.1780400609.
29. Kim YG, Choi J, Kim K. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for effective cartilage tissue repair and treatment of osteoarthritis. *Biotechnol J*. 2020;15:e2000082. doi: 10.1002/biot.202000082.
30. Kang SW, Do HJ, Han IB, Shin DA, Kim HO, Kim JH, et al. Increase of chondrogenic potentials in adipose-derived stromal cells by co-delivery of type I and type II TGF β receptors encoding bicistronic vector system. *J Control Release*. 2012; 160(3):577-82. doi:10.1016/j.jconrel.2012.04.011.
31. ULAM Rabbit Anesthesia and Analgesia Guidelines. 20 Guidelines/ULAM 2 OSOP 20 Rabbit 20. Anesthesia. <https://az.research.umich.edu/animalcare/guidelines/guidelines-anesthesia-and-analgesia-rabbits>.

Надійшла до редакції 09.11.2023

© О.Ф. Мельников, Ю.В. Мінін, М.Д. Тимченко, Т.І. Кучеренко, Г.Ю. Мініна

ВМІСТ ТРАНСФОРМУЮЧОГО ФАКТОРА РОСТУ TGF 1 ТА ІНТЕРЛЕЙКИНУ 6 В СИРОВАТЦІ КРОВІ КРОЛІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ ТРАВМОЮ ВУШНОЇ РАКОВИНИ ПІСЛЯ СИСТЕМНОГО ЗАСТОСУВАННЯ АЛОГЕННИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН МЕЗЕНХІМАЛЬНОГО ПОХОДЖЕННЯ

*Мельников ОФ, Мінін ЮВ, Тимченко МД, Кучеренко ТІ, Мініна АЮ
Державна установа «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка
Національної академії медичних наук України»
Email: tkucherenko@hotmail.com*

А н о т а ц і я

Актуальність: Застосування стовбурових клітин (СК) при пошкодженні хрящів є перспективним і необхідним напрямком: зрілі хондроцити мають знижений потенціал поділу, в результаті чого природна репарація дефектів хрящової тканини, зокрема вуха та крил носа, відбувається шляхом фіброплазії, а не регенерації. Імунологічні та патофізіологічні аспекти терапії алогенними СК великою мірою залежать від системної і місцевої дії цитокінів та інших біологічно активних речовин (БАР) як з боку реципієнта, так і самих СК. Аспекти цих взаємовідносин багатогранні та неоднозначні, отже потребують ретельного вивчення та аналізу. Серед багатьох БАР, що впливають на хондрогенез, особливу увагу привертають такі поліфункціональні агенти, як трансформуючий фактор росту TGF- β 1 та інтерлейкін-6. Активація гену TGF- β 1 відбувається у відповідь на пошкодження тканин, функціями TGF- β 1, зокрема, є стимуляція проліферації та активності фіброblastів, цей цитокін також регулює експресію генів, що кодують колагени. ІЛ-6 чинить, здебільшого, прозапальну дію: стимулює міграцію моноцитів, одночасно пригнічуючи проліферацію фіброblastів, підсилює функціональну активність остеокластів, що може призводити до деградації хряща. Але невелика кількість ІЛ-6 діє як хондропротектор, інгібуючи активність руйнівних металопротеїназ.

Мета: вивчення динаміки змін прозапальних та регенераторних цитокінів після системного використання нативних та прекодиційованих мезенхімальних стовбурових клітин (МСК).

Матеріал і методи: До експериментальних досліджень було залучено 44 дорослих кролів породи «сірий велетень», яких після моделювання травми вухної раковини було розподілено на дві групи – контрольну (14 тварин) та експериментальну (30 тварин). Тварин експериментальної групи, в свою чергу, було розподілено на дві підгрупи. Кожній тварині 1-ї підгрупи (16 тварин) одноразово внутрішньовенно вводили 5 млн. нативних алогенних МСК, 2-ї підгрупи (14 тварин) – по 5 млн. прекодиційованих алогенних МСК. В сироватці крові

тварин дослідної та контрольної груп методом імуноферментного аналізу (ІФА) вивчався вміст інтерлейкіну-6 та трансформуючого фактора росту TGF- β 1.

Результати та обговорення: Вміст досліджуваних цитокінів визначався в динаміці спостереження, протягом 3 місяців після експериментальної травми. Виявлено статистично вірогідне ($p < 0,05$) зменшення кількості TGF- β 1 у тварин через 3 місяці після моделювання травми і введення нативних МСК порівняно з контролем. При порівнянні результатів дослідної та контрольної групи, отриманих на інших строках після пошкодження хряща вуха, не виявлено статистично достовірних розбіжностей. Визначається статистично вірогідне ($p < 0,05$) зменшення кількості ІЛ-6 у дослідних тварин через 3 місяці після експериментальної травми і введення нативних МСК при порівнянні з контрольною групою. Аналогічні зміни спостерігалися при застосуванні як нативних, так і прекондиційованих стовбурових клітин. Достовірних розбіжностей у вмісті TGF- β 1 та ІЛ-6 в сироватці крові експериментальних тварин при застосуванні нативних чи прекондиційованих МСК не виявлено.

Висновки: Системне застосування МСК супроводжується змінами цитокінового профілю, зокрема, вмісту TGF- β 1 та ІЛ-6. Не виявлено достовірних розбіжностей у вмісті TGF- β 1 та ІЛ-6 в сироватці крові експериментальних тварин при застосуванні нативних і прекондиційованих алогенних МСК.

Ключові слова: Мезенхімальні стовбурові клітини, регенерація, хрящ, прекондиціонування, цитокіни.

CONTENT OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR TGF 1 AND INTERLEUKIN 6 IN THE BLOOD SERUM OF RABBITS WITH EXPERIMENTAL INJURY OF THE AURICLE AFTER SYSTEMIC APPLICATION OF ALLOGENEOUS STEM CELLS OF MESENCHYMAL ORIGIN

Melnikov OF, Minin YuV, Tymchenko MD, Kucherenko TI, Minina AYU
State institution "Institute of Otolaryngology named after Prof. O.S. Kolomiychenko
National Academy of Medical Sciences of Ukraine"
Email: tkucherenko@hotmail.com

Abstract

Relevance: The use of stem cells (SC) in cartilage damage is a promising and necessary direction: mature chondrocytes have a reduced division potential, as a result of which the natural repair of cartilage tissue defects, in particular the ear and nasal wings, occurs through fibroplasia, not regeneration. Immunological and pathophysiological aspects of therapy with allogeneic SCs largely depend on the systemic and local effect of cytokines and other biologically active substances (BAS) both on the part of the recipient and on the SCs themselves. Aspects of these relationships are multifaceted and ambiguous, so they require careful study and analysis. Among the many BARs affecting chondrogenesis, such multifunctional agents as transforming growth factor TGF- β 1 and interleukin-6 attract special attention. The activation of the TGF- β 1 gene occurs in response to tissue damage, the functions of TGF- β 1, in particular, are the stimulation of the proliferation and activity of fibroblasts, this cytokine also regulates the expression of genes encoding collagens. IL-6 has, for the most part, a pro-inflammatory effect: it stimulates the migration of monocytes, simultaneously suppressing the proliferation of fibroblasts, and enhances the functional activity of osteoclasts, which can lead to cartilage degradation. But a small amount of IL-6 acts as a chondroprotector, inhibiting the activity of destructive metalloproteinases.

Purpose: To study the peculiarities of the dynamics of cytokine changes during the systemic use of native and preconditioned MSCs.

Material and methods: 44 rabbits were under supervision, in which the content of TGF- β 1 and IL-6 in the blood serum of rabbits of experimental and control groups was determined by enzyme immunoassay (ELISA). Experimental groups of animals were intravenously injected once with 5 million native or preconditioned allogeneic MSCs after modeling the injury.

Results and discussion: Systemic use of MSCs is accompanied by systemic changes in the cytokine profile, in particular, TGF- β 1 and IL-6. It is possible that the anti-inflammatory effect of MSCs (both direct and indirect) is a crucial part of this effect. In our study, no statistically significant differences were found in the content of TGF- β 1 and IL-6 in the blood serum of experimental animals when using native or preconditioned MSCs.

It was found that in animals after the introduction of MSCs, a lower level of TGF- β 1 and IL-6 was determined 3 months after the start of observation. Similar changes were observed when using both native and preconditioned stem cells.

Conclusions: Systemic use of MSCs is accompanied by changes in the cytokine profile, in particular, TGF- β 1 and IL-6. In our study, no significant differences were found in the content of TGF- β 1 and IL-6 in the blood serum of experimental animals when using native and preconditioned allogeneic MSCs.

Key words: Mesenchymal stem cells, regeneration, cartilage, preconditioning, cytokines.