



Се-Фей

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

© Се-Фей

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ УДАРНО – ХВИЛЬОВОЇ ТЕРАПІЇ НА ІМУННІ МАРКЕРИ СИРОВАТКИ КРОВІ В ЕКСПЕРИМЕНТІ ПІСЛЯ ТРАВМИ КІСТОК У КРОЛІВ

**Резюме.** 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. Метою дослідження було вивчення впливу ЕРУХТ на активність імунних клітин при експериментальній травмі кісток. 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 досліджень показали, 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 століття знайшла застосування при лікуванні свіжих переломів довгих кісток, псевдоартрозів і незрослих переломів. Не дивлячись на основний ефект активізації кісткоутворювальних процесів, механізм впливу цього методу до теперішнього часу залишається невиясненим [1, 3, 7]. Встановлено, що під впливом ЕРУХТ спостерігається значний підйом кількості Р-субстанції — речовини, яка володіє імунореактивними властивостями і є у кістковому мозку кісток [4, 9]. 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 [8]. Наведені дані обумовлюють необхідність вивчення впливу ЕРУХТ на імунні клітини за наявності експериментальної травми кістки.

### Матеріали та методи досліджень

Експериментальні дослідження на тваринах виконано 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. Потебнею 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. Stan-kojkovicetal. у власній модифікації [2, 9]. При цьому досліджували цитотоксичну активність лімфоцитів, антитіл залежну цитотоксичність лімфоцитів, цитотоксичну активність макрофагів.

**Результати досліджень та їх обговорення**

При дослідженні цитотоксичної активності 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±0,77) %, проти (43,81±1,22) %, так і дослідної групи – до (2,82±0,08) % проти (41,65±1,31) % на початку експерименту, при p<0,001 в обох групах тварин (рис. 1).

Скоріш за все, різке зниження функціональної активності лімфоцитів відбувалось через больовий синдром. При цьому не визначено достовірних відмінностей показників між контрольною та дослідною групами кроликів у показниках цитотоксичної активності лімфоцитів як на початку експерименту, так і на другу його добу (p>0,05). На 15-ту та 30-ту добу активність лімфоцитів у кроликів обох груп відновлювалась і становила у кроликів контрольної групи (18,71±8,43) % та (36,18±1,5) % відповідно, у кроликів дослідної групи (27,43±6,15) % та (42,74±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±11,56) % (p<0,05), в той же час у кролів дослідної групи вона була навіть вища за початковий рівень – (56,80±3,03) % (p<0,02).

При дослідженні антитілозалежної 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±3,17) %, проти (54,09±1,89) % – на початку досліджу; у дослідних тварин – (24,09±4,61) % проти (51,19±4,56) %, при p < 0,001 в обох групах тварин (рис. 2).

На 15-ту та 30-ту добу після травми та проведеного лікування ЕРУХТ (дослідна група) антитілозалежна цитотоксичність лімфоцитів становила у контрольній групі тварин відповідно (36,45±0,92) та (36,39±0,14) %, у дослідних тварин – (47,85±2,53) % та (49,07±3,15) % при p<0,05 між двома групами тварин. На 45-ту добу антитілозалежна цитотоксичність лімфоцитів піднялася до (45,0±0,67) у контрольних тварин і до (64,75±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±1,09) і 9(,88±5,38) % відповідно – у кроликів контрольної групи та (12,8±2,16) і (16,01±4,32) % – у кроликів дослідної групи (рис. 3), p<0001 в обох групах в порівнянні з нормативом.

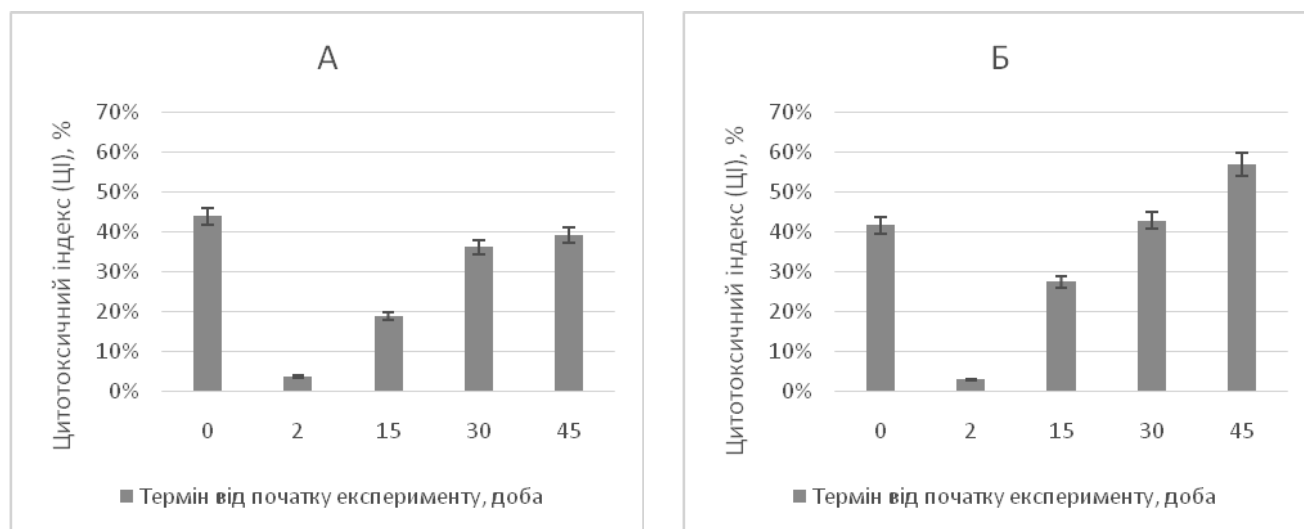


Рис. 1. Цитотоксична активність лімфоцитів у кролів контрольної (А), та дослідної (Б) груп

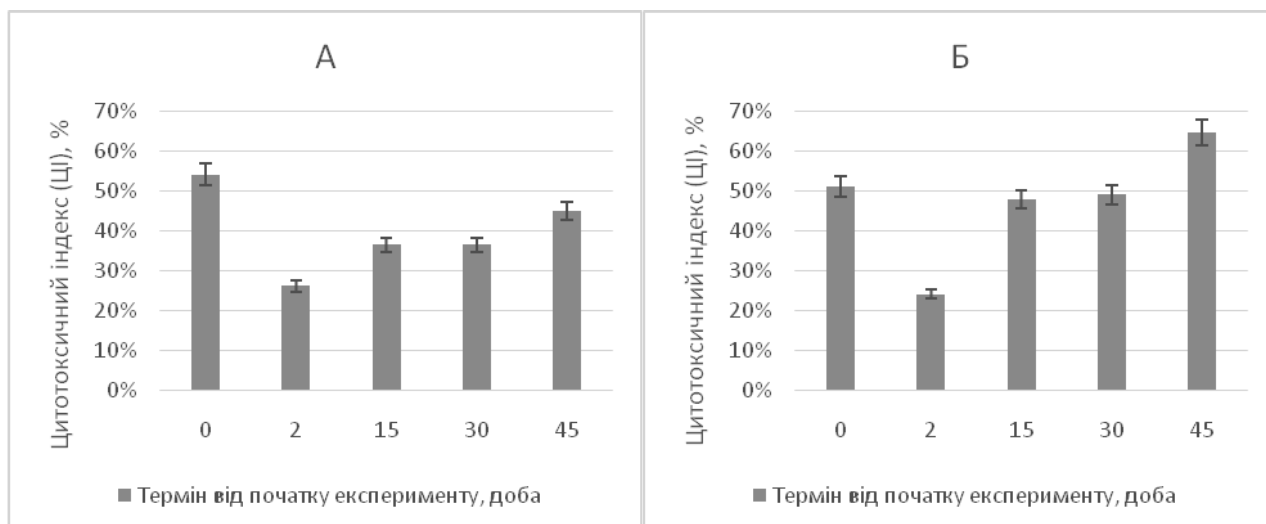


Рис. 2. Антитілозалежна цитотоксична активність лімфоцитів у кролів контрольної (А), та дослідної (Б) груп

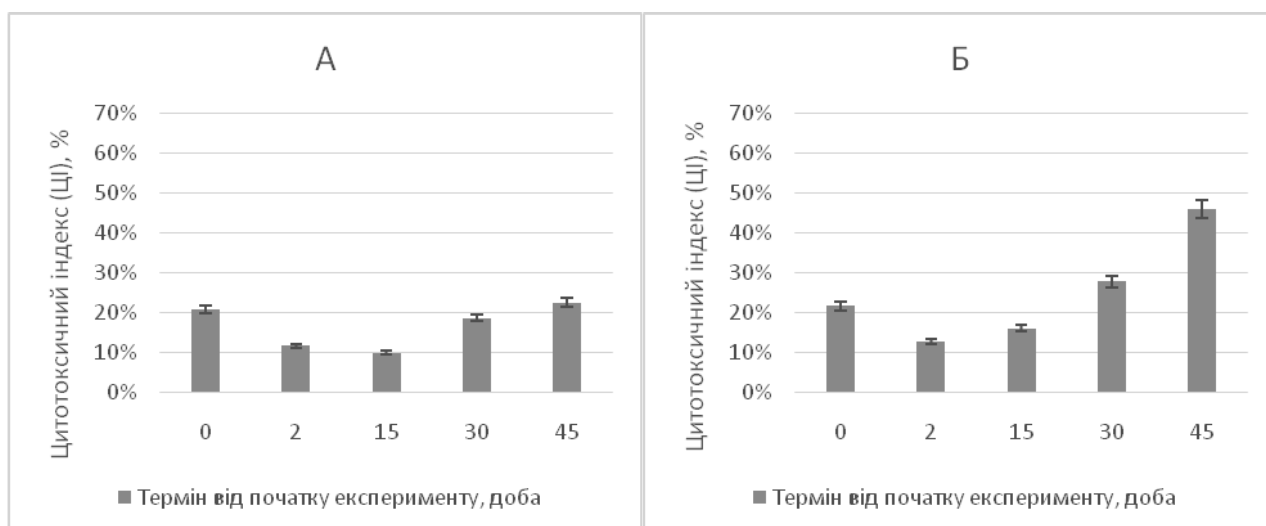


Рис. 3. Цитотоксична активність макрофагів у кролів контрольної (А), та дослідної (Б) груп

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.

Як показали виконані експериментальні дослідження у кроликів після травми великогомілкової кістки відбувається зниження

активності імунних клітин у СК, у 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 швидко нормалізація активності імунних клітин після травми кістки, а і підвищення їх активності в динаміці дослідження.

### Висновки

Результати дослідження показали, що травма кістки у кролів призводить до значного зниження функціональної активності імунних клітин на ранніх термінах досліду (друга доба)

та прояву пригніченого впливу аутологічної СК на функціональну активність макрофагів на 15 добу після травми.

Травма кісток у кролів призводить до часткового паралічу функціональної активності імунних клітин СК, при цьому ударно-хвильова терапія не тільки забезпечує нормальну активність імунних клітин, але призводить до їх збільшення, що є одним із механізмів активізації процесів репаративного остеогенезу.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Борзых А. В. Особенности лечения переломов и ложных суставов ладьевидной кости у спортсменов / А. В. Борзых, И. А. Соловьев // Спортивная медицина. — 2013. — № 1. — С. 29–33.
2. Дворщенко О. С. Моделивання ксеногенних клітинних систем на твердих фазах з використанням пухлиноасційованих та ембріональних антигенів та їх застосування в протипухлинній терапії / О. С. Дворщенко, Г. В. Діденко, О. І. Чередарчук // Доповіді НАН України. — 2007. — № 12. — С. 155–161.
3. Егорова Е. А. Экстракорпоральная ударно-волновая терапия в лечении переломов костей конечностей / Е. А. Егорова, А. Ю. Васильев // 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) / О. А. Островський // Спортивна медицина. — 2013. — № 1. — С. 7–11.
5. Ching-Jen Wang. Biological effects of extracorporeal shockwave in bone healing; a study in rabbits / Ching-Jen Wang, Feng-Shing Wang, Kuender D. Yang. // Arch. Orthop. Trauma Surg. — 2012. — Vol. 31. — P. 756–764.
6. Dahmen G. P. Skrodies : Extracorporeal stosswellentherapie (ESWT) in knochenahen weichteilbeveichan der Schulter / G. P. Dahmen // Extracta Orthoped. — 1992. — Vol. 11. — P. 25–27.
7. Effects of extracorporeal Shock Wave Therapy on Fracture Nonunions / M. C. Vulpiani, M. Vetrano, F. Conforti, L. Minutolo // The American Journal of Orthopedics. — 2012. — Vol. 41, № 9. — P. 122–127.
8. 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.
9. Shin C. Neurogenic Substance P stimulates osteogenesis in vitro / Dahmen G. P. // Peptides. — 1997. — Vol. 18. — P. 3223–3232.
10. The antitumor immune response in HER-2 positive, metastatic breast cancer patients / T. P. Stanojkovic, Z. Zizak, T. Srdic [et al.] // J. Transl. Med. — 2005. — № 3. — P. 13–16.



ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ  
УДАРНО-ВОЛНОВОЙ  
ТЕРАПИИ НА ИММУННЫЕ  
МАРКЕРЫ СЫВОРОТКИ  
КРОВИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ  
ПОСЛЕ ТРАВМЫ КОСТИ  
У КРОЛИКОВ

*Се-Фей*

**Резюме.** Экстракорпоральная радиальная ударно-волновая терапия (ЭРУВТ) активизирует костеобразовательные процессы, однако механизм этого эффекта до настоящего времени не выяснен, отдельные работы показывают интенсификацию иммунокомпетентных клеток. Целью исследования было изучение влияния ЭРУВТ на активность иммунных клеток при экспериментальной травме костей. 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 исследований показали, 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.*

INVESTIGATION OF THE  
EFFECT OF SHOCK-WAVE  
THERAPY ON IMMUNE  
MARKERS IN BLOOD  
SERUM IN EXPERIMENT  
AFTER BONE INJURY  
IN RABBITS

*Se Fei*

**Summary.** The extracorporeal shock wave therapy (ESWT) leads to the activity of reparative osteogenesis, but this effect is not fully studied till today. The present study was aimed at learning about extracorporeal shock wave therapy effect on activity of the immune cells provided presence of experimental bones trauma. 24 rabbits were inflicted with shinbone metadiaphysis defect by way of its perforation in aseptic conditions. 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 thorough study of cytotoxic activity of lymphocytes, macrophages and antibodies-dependent cytotoxicity of lymphocytes prior to trauma and 2, 15, 30 and 45 days after its infliction. The findings of the study showed that the experimental bone trauma leads to partial paralysis of the immune markers' functional activity is traced against the background of bone trauma; this being the case extracorporeal shock wave therapy leads to increase in the number of immune cells up to the end of the study, rather than only restores their normal activity.

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