

УДК 616.711/.714-001-085.361:611.013)-097-092.9

БОРИС Р.М.<sup>1</sup>, ГОЖЕНКО А.І.<sup>1</sup>, ГУДИМА А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ДП «Український науково-дослідний інститут медицини транспорту МОЗ України», м. Одеса

<sup>2</sup>ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»

## ПОРУШЕННЯ ГУМОРАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ В ДИНАМІЦІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ КРАНІОСКЕЛЕТНОЇ ТРАВМИ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЯ ФЕТАЛЬНИМИ НЕРВОВИМИ КЛІТИНАМИ

**Резюме.** За умов експериментальної краніоскелетної травми відзначаються виражені порушення гуморального імунітету, що супроводжуються накопиченням у сироватці крові циркулюючих імунних комплексів та коливальними відхиленнями вмісту Ig класів А, М і G, що характеризуються зростанням імуноглобулінів упродовж 14 діб спостереження з подальшим розвитком гуморальної імуносупресії. Уведення суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин потенціює компенсаторні механізми у перші 7 діб експерименту і сприяє виведенню циркулюючих імунних комплексів з організму на 25-ту добу. Клітинна терапія при краніоскелетній травмі нормалізує вміст Ig класів А, М і G упродовж 14 діб спостереження з наступною активацією гуморальної ланки імунної системи.

**Ключові слова:** краніоскелетна травма, гуморальний імунітет, клітинна терапія.

### Вступ

У структурі травматизму останнім часом відзначається невпинна тенденція до зростання частоти поєднаної травми, що становить 23,5–85,0 % і характеризується тяжкими ускладненнями та високою летальністю [3, 8]. В Україні щорічно понад 70 тис. людей отримують травми різного ступеня, при цьому політравма є основною причиною смерті людей віком до 40 років [6].

Ефективність медикаментозної терапії при політравмі залишається низькою, у зв'язку з чим останніми роками ведеться пошук принципово нових підходів до корекції цього патологічного процесу. Серед них важливе місце займає застосування фетальних нервових клітин, які завдяки синтезу ряду біологічно активних речовин здатні здійснювати надсистемний вплив на організм і нівелювати ряд патогенних механізмів, притаманних травматичній хворобі [1], що вимагає експериментального підтвердження.

**Мета роботи:** вивчити вплив суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин щура на вміст циркулюючих імунних комплексів, імуноглобулінів класів А, М, G сироватки крові в динаміці періодів ранніх і пізніх проявів травматичної хвороби.

### Матеріали і методи

Експерименти виконано на 104 нелінійних білих щурах-самцях масою 180–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин розділили на три групи: контрольну і дві дослідні. У контрольну групу увійшли 8 інтактних тварин. В обох дослідних групах — по 48 тва-

рин під тіопентало-натрієвим наркозом (40 мг • кг<sup>-1</sup> маси тіла) моделювали закриту черепно-мозкову травму за методикою [2] у власній модифікації. Енергія удару становила 0,375 Дж, що відповідало травмі середнього ступеня тяжкості. Крім цього, спеціально розробленим пристроєм наносили однократний удар по кожному стегну, що викликало закритий перелом стегнових кісток.

Через 12 год після травмування в одній із дослідних груп внутрішньочеревно вводили суспензію кріоконсервованих фетальних нервових клітин щура в дозі  $5 \cdot 10^6$  клітин на 100 г маси тварини [1]. Суспензію фетальних нервових клітин виготовляли в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків) шляхом ощадної механічної дисоціації фрагментів мозку ембріонів щурів 11 діб гестації й кріоконсервування на програмному заморожувачі УОП-6. Відігрівання зразків проводили на водяній бані при температурі 37 °С. В іншій дослідній групі внутрішньочеревно вводили еквівалентний об'єм фізіологічного розчину.

У тварин, які вижили, у сироватці крові визначали вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) методом преципітації розчином поліетиленгліколю 6000 [5] та вміст імуноглобулінів основних класів А, М і G імуноферментним методом з використанням аналізатора Stat Fax (USA).

© Борис Р.М., Гоженко А.І., Гудима А.А., 2013

© «Травма», 2013

© Заславский А.Ю., 2013

Вірогідність відмінностей між дослідними й контрольною групою оцінювали за критеріями Стьюдента з використанням прикладного пакета Stat Soft Statistica 10.

Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувалися міжнародних вимог про гуманне поводження з тваринами відповідно до правил «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою» (European Convention, 1984); методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України «Доклінічні дослідження лікарських засобів» (2001). Евтаназію щурів в усіх експериментах проводили шляхом тотального кровопускання з серця після попереднього тіопентало-натрієвого наркозу ( $60 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$  маси тіла тварини внутрішньочеревно).

## Результати досліджень та їх обговорення

З огляду на дані табл. 1 за умов краніоскелетної травми спостерігалася тривала підвищена циркуляція імунних комплексів із максимальним зростанням на 25-ту добу. Так, ЦІК на 3-тю добу зросли на 55,2 % стосовно контролю ( $p < 0,001$ ), а на 7-му добу — на 77,7 % ( $p < 0,001$ ), на 14-ту добу — на 65,8 % ( $p < 0,001$ ), на 25-ту добу — на 90,5 %. На 25-ту добу вміст ЦІК у сироватці крові перевищував показники в попередні терміни спостереження відповідно на 22,9; 7,1 і 14,9 % ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 1).

Збільшення концентрації ЦІК у крові відображає формування системних реакцій, які зумовлюють розвиток порушень гомеостазу, зокрема відкладання імунних комплексів у судинній стінці, що веде до розвитку запалення практично у всіх судинах

**Таблиця 1. Рівень циркулюючих імунних комплексів та імуноглобулінів класів А, М, G за умови експериментальної краніоскелетної травми, корегованої клітинною терапією ( $M \pm m$ )**

Умови експерименту	3-тя доба	7-ма доба	14-та доба	25-та доба
Циркулюючі імунні комплекси, ум.од. Контроль = $53,39 \pm 1,69$ ум.од. ( $n = 8$ )				
Без корекції	$82,85 \pm 3,21^{***}$	$94,88 \pm 3,41^{***}$	$88,50 \pm 2,07^{***}$	$101,7 \pm 2,3^{***}$
	( $n = 7$ )	( $n = 6$ )	( $n = 7$ )	( $n = 8$ )
Клітинна терапія	$96,07 \pm 3,05^{***}$	$96,9 \pm 2,45^{***}$	$88,60 \pm 2,28^{***}$	$94,42 \pm 1,91^{***}$
	( $n = 8$ )	( $n = 8$ )	( $n = 10$ )	( $n = 9$ )
p	< 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05
IgA Контроль = $0,33 \pm 0,01 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ ( $n = 8$ )				
Без корекції	$0,40 \pm 0,02^{**}$	$0,42 \pm 0,02^{**}$	$0,47 \pm 0,02^{***}$	$0,40 \pm 0,01^{***}$
	( $n = 7$ )	( $n = 6$ )	( $n = 7$ )	( $n = 8$ )
Клітинна терапія	$0,36 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,02^{***}$	$0,43 \pm 0,02^{***}$
	( $n = 8$ )	( $n = 8$ )	( $n = 10$ )	( $n = 9$ )
p	< 0,10	< 0,05	> 0,05	> 0,05
IgM Контроль = $0,52 \pm 0,02 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ ( $n = 8$ )				
Без корекції	$0,55 \pm 0,02$	$0,47 \pm 0,02$	$0,59 \pm 0,02^*$	$0,57 \pm 0,02$
	( $n = 7$ )	( $n = 6$ )	( $n = 7$ )	( $n = 8$ )
Клітинна терапія	$0,52 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,01$	$0,54 \pm 0,02$
	( $n = 8$ )	( $n = 8$ )	( $n = 10$ )	( $n = 9$ )
p	> 0,05	> 0,05	< 0,01	> 0,05
IgG Контроль = $0,84 \pm 0,04 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ ( $n = 8$ )				
Без корекції	$0,93 \pm 0,02$	$0,97 \pm 0,03^*$	$1,03 \pm 0,04^{**}$	$0,98 \pm 0,04^*$
	( $n = 7$ )	( $n = 6$ )	( $n = 7$ )	( $n = 8$ )
Клітинна терапія	$0,98 \pm 0,03^*$	$0,98 \pm 0,02^{**}$	$0,96 \pm 0,03^*$	$1,12 \pm 0,04^{***}$
	( $n = 8$ )	( $n = 8$ )	( $n = 10$ )	( $n = 9$ )
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05

**Примітки:** \*\*\* — вірогідність відмінностей між контрольною і дослідними групами; p — вірогідність відмінностей між показниками до і після корекції в межах одного терміну спостереження.

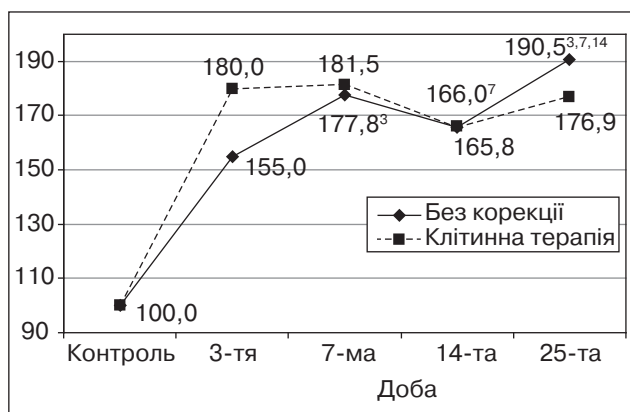
мікроциркуляторного русла [4]. У той же час різке зростання вмісту ЦІК у сироватці крові за умов краніоскелетної травми у перші 7 діб можна розцінити як захисно-компенсаторну реакцію, що направлена на зв'язування надлишку циркулюючих антигенів. Виснаження компенсаторних механізмів на 14-ту добу зумовлює в подальшому реакцію пошкодження, що характеризується наростанням концентрації ЦІК (25-та доба) і призводить до генералізації запальної реакції.

Введення суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин щурам із модельованою краніоскелетною травмою показало, що на 3-тю добу вміст ЦІК зріс на 55,2 % стосовно контролю ( $p < 0,001$ ) і на 16,0 % порівняно з результатами до корекції ( $p < 0,05$ ). У групі тварин на 7-му і 14-ту доби рівень імунних комплексів практично не відрізнявся як до корекції, так і після проведення клітинної терапії, проте вже на 25-ту добу вміст ЦІК зменшувався на 7,2 % стосовно отриманих даних до введення суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин ( $p < 0,05$ ), хоча й залишався на 76,9 % вищим від показників контролю.

Можна припустити, що протягом перших 7 діб при застосуванні суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин відмічається потенціювання компенсаторних механізмів, спрямованих на посилення елімінації антигенів у травмованому організмі шляхом утворення ЦІК. На 25-ту добу експерименту проведена клітинна терапія сприяла більшому саногенному ефекту, що супроводжувалося зменшенням утворення ЦІК, очевидно за рахунок зменшення утворення антигенів.

У тварин із краніоскелетною травмою вміст IgA зростав порівняно з показниками контрольної групи на 3-тю добу на 21,2 %, на 7-му — на 27,3 %, на 14-ту — на 42,4 %. На 25-ту добу експерименту відмічено зниження вмісту IgA в 1,14 раза відносно попередньої дослідної групи ( $p \leq 0,05$ ), проте він залишався на 21,1 % вищим від контролю ( $p < 0,001$ ) (табл. 1, рис. 2).

Уведення суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин на 3-тю добу зумовлювало тенденцію

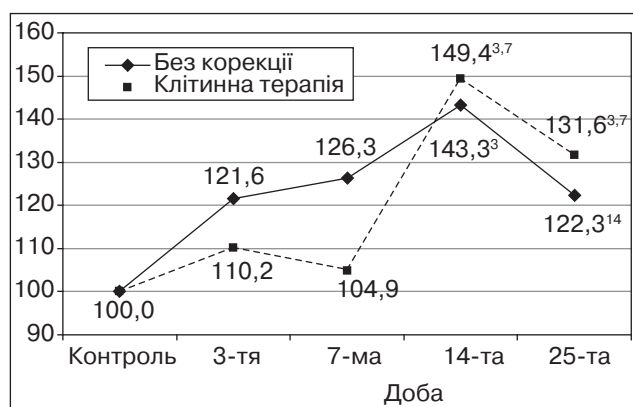


**Рисунок 1. Динаміка відхилень вмісту циркулюючих імунних комплексів сироватки крові (у відсотках від рівня контролю) у тварин із краніоскелетною травмою під впливом клітинної терапії**

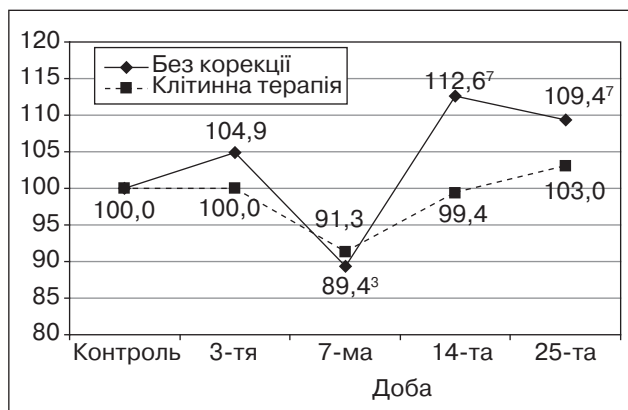
до зменшення вмісту IgA (на 11,4 %,  $p < 0,10$ ) стосовно групи тварин без корекції. На 7-му добу під впливом клітинної терапії вміст IgA зменшився на 21,6 % порівняно з даними групи без корекції ( $p < 0,05$ ) і практично не відрізнявся від контролю. На 14-ту добу введення суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин зумовлювало різке зростання вмісту IgA, що досягало рівня некорегованих тварин і перевищувало контроль на 49,4 % ( $p < 0,001$ ). На 25-ту добу величина даного показника зменшувалася, проте істотно не відрізнялася від групи некорегованих тварин ( $p > 0,05$ ) і на 30,3 % перевищувала рівень контролю ( $p < 0,001$ ).

Уміст IgM у тварин із модельованою краніоскелетною травмою характеризувався фазовими відхиленнями (табл. 1, рис. 3). Через 7 діб даний показник знижувався стосовно контрольної групи (на 9,7 %), проте результат виявився статистично невірогідним. На 14-ту добу він зростав на 13,5 % ( $p < 0,05$ ) і в подальшому (на 25-ту добу) повертався до рівня контролю. Проведення корегувальної клітинної терапії зумовлювало стабільний уміст цього показника впродовж експерименту, що статистично вірогідно не відрізнявся від контрольної групи. На 14-ту добу він виявився істотно меншим, ніж у групі некорегованих тварин (на 11,9 %,  $p < 0,01$ ).

У свою чергу, уміст IgG в умовах краніоскелетної травми (табл. 1, рис. 4) досягав максимального рівня на 14-ту добу посттравматичного періоду, зокрема, на 7-му добу він був вищий від контрольних величин на 15,3 % ( $p < 0,05$ ), на 14-ту добу виявився на 22,1 % більшим ( $p < 0,01$ ), тоді як на 25-ту добу мав тенденцію до зниження, проте залишався на 16,7 % вищим ( $p < 0,05$ ). Потрібно відмітити, що цифрові величини у наведених дослідних групах істотно не відрізнялися між собою. Використання суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин щурам за умови краніоскелетної травми зумовлювало наростаючі зміни вмісту IgG. Так, на 3-тю добу відмічено підвищення даного показника на 16,1 % ( $p < 0,05$ ), що практично не змінювався до 14-ї доби з наступним різким зростанням на 25-ту добу на 32,8 % стосовно контролю ( $p < 0,001$ ). Потрібно відмітити, що в цій експериментальній групі застосування



**Рисунок 2. Динаміка відхилень вмісту IgA сироватки крові (у відсотках від рівня контролю) у тварин із краніоскелетною травмою під впливом клітинної терапії**



**Рисунки 3. Динаміка відхилень вмісту IgM сироватки крові (у відсотках від рівня контролю) у тварин із краніоскелетною травмою під впливом клітинної терапії**

клітинної терапії зумовлювало відсутність істотних відмінностей на 3-ї — 14-ї доби спостереження, у той час як на 25-ту добу сприяло підвищенню вмісту IgG в 1,14 раза порівняно із групою некорегованих тварин ( $p < 0,05$ ).

Отримані результати свідчать про те, що за умови краніоскелетної травми до 14-ї доби відбувається підвищення запальної реакції й активація імунної відповіді, що характеризувалася максимальним зростанням імуноглобулінів класів А, М і G. Проте встановлено, що за умови політравми підвищений катаболізм часто призводить до білково-енергетичної недостатності, що супроводжується використанням жирової і м'язової тканини як субстрату [7]. Це може призвести до зниження імунної функції, що проявлялось у нашому дослідженні зниженням усіх класів імуноглобулінів на 25-ту добу спостереження.

Уведення суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин зумовлювало нормалізацію IgA й IgM у перші 7 днів експерименту, IgG — до 14-ї доби дослідження. За умови гуморальної імуносупресії, що розвивалася на 25-ту добу, застосування клітинної терапії сприяло активації гуморальної ланки імунітету, що є дуже важливим для запобігання розвитку інфекційних ускладнень і поліорганної недостатності.

## Висновки

1. За умов експериментальної краніоскелетної травми відмічаються виражені порушення гуморального імунітету, які супроводжуються накопиченням у сироватці крові ЦІК та коливальними відхиленнями вмісту Ig класів А, М і G, що характеризуються зростанням імуноглобулінів впродовж 14 днів спостереження з подальшим розвитком гуморальної імуносупресії.

2. Уведення суспензії кріоконсервованих фетальних нервових клітин потенціює компенсаторні механізми у перші 7 днів експерименту і сприяє виведенню ЦІК з організму на 25-ту добу. Клітинна терапія при краніоскелетній травмі нормалізує вміст Ig класів А, М і G впродовж 14 днів спостереження з наступною активацією гуморальної ланки імунної системи.

**Рисунки 4. Динаміка відхилень вмісту IgG сироватки крові (у відсотках від рівня контролю) у тварин із краніоскелетною травмою під впливом клітинної терапії**

Перспективи подальших досліджень. У перспективі передбачається поглибити вивчення ролі цитокинової регуляції в розвитку імунних дисфункцій в умовах краніоскелетної травми з метою розробки методів системної корекції.

## Список літератури

1. Гольцев А.Н. Апоптотические процессы в тимусе и головном мозге при развитии экспериментального аллергического энцефаломиелита до и после лечения фетальными нервными клетками / А.Н. Гольцев, Е.А. Порожан, Н.Н. Бабенко, М.В. Останков // Патология. — 2001. — Т. 8, № 2. — С. 69-72.
2. Ельский В. Н. Моделирование черепно-мозговой травмы / В.Н. Ельский, С.В. Зяблицев. — Донецк: Новый мир, 2008. — 140 с.
3. Соколова Ф.М. Адаптивные возможности ранней реабилитации у детей с тяжелой ЧМТ / Ф.М. Соколова, Т.Г. Топорук, В.П. Берсенов // Актуальные вопросы неврологии и нейрохирургии: Сб. науч. тр. — Ростов-н/Д., 2005. — С. 112-113.
4. Патюков К.А. Оптимизация патогенетической оценки эндотоксикоза у больных с травматической болезнью головного мозга: Автореф. дис... канд. мед. наук: спец. 14.00.16 «Патологическая физиология» / К.А. Патюков. — Омск, 2008. — 23 с.
5. Оценка влияния факторов окружающей среды на иммунологическую реактивность организма: Методические рекомендации / НИИ общей и коммунальной гигиены им. А.Н. Марзеева. — К., 1988. — 23 с.
6. Проблема політравми в Україні / А.А. Шалимов, В.Л. Белый, Г.В. Гайко [та ін.] // Політравма — сучасна концепція надання медичної допомоги. — 2002. — С. 5-8.
7. Effects of enteral immunonutrition on immune function in patients with multiple trauma / Sha-Luo Li, Yong-Hua Xu, Xi Wang [et al.] // World J. Emerg. Med. — 2011. — Vol. 2, № 3. — P. 206-209.
8. Peden M. World report on road traffic injury prevention. / M. Peden, R. Scurfield, D. Sleet [et al.] // Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Отримано □

Борис Р.Н.<sup>1</sup>, Гоженко А.И.<sup>1</sup>, Гудыма А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГП «Украинский научно-исследовательский институт медицины транспорта МЗ Украины», г. Одесса

<sup>2</sup>ГБУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского МЗ Украины»

#### НАРУШЕНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КРАНИОСКЕЛЕТНОЙ ТРАВМЫ И ЕГО КОРРЕКЦИЯ ФЕТАЛЬНЫМИ НЕРВНЫМИ КЛЕТКАМИ

**Резюме.** При экспериментальной краниоскелетной травме отмечаются выраженные нарушения гуморального иммунитета, сопровождающиеся накоплением в сыворотке крови циркулирующих иммунных комплексов и колебательными отклонениями содержания Ig классов А, М и G, которые характеризуются ростом иммуноглобулинов в течение 14 суток наблюдения с последующим развитием гуморальной иммуносупрессии. Введение суспензии криоконсервированных фетальных нервных клеток потенцирует компенсаторные механизмы в первые 7 суток эксперимента и способствует выведению циркулирующих иммунных комплексов из организма на 25-е сутки. Клеточная терапия при краниоскелетной травме нормализует содержание Ig классов А, М и G в течение 14 суток наблюдения с последующей активацией гуморального звена иммунной системы.

**Ключевые слова:** краниоскелетная травма, гуморальный иммунитет, клеточная терапия.

Borys R.M.<sup>1</sup>, Gozhenko A.I.<sup>1</sup>, Gudyma A.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Institution «Ukrainian Research Institute of Transport Medicine of Ministry of Public Health of Ukraine», Odesa

<sup>2</sup>State Higher Educational Institution «Ternopil State Medical University named after I. Ya. Gorbachevsky», Ternopil, Ukraine

#### VIOLATION OF HUMORAL IMMUNITY IN THE DYNAMICS OF EXPERIMENTAL CRANIO-SKELETAL INJURY AND ITS CORRECTION BY FETAL NERVE CELLS

**Summary.** In experimental cranio-skeletal injury there are being detected significant violations in humoral immunity, accompanied by the accumulation of serum circulating immune complexes in the blood serum and vibrational deviations in the content of Ig of A, M and G classes, which are characterized by the increase in immunoglobulin level within 14 days of observation and the subsequent development of the humoral immune suppression. The introduction of a suspension of cryopreserved fetal nerve cells potentiates the compensatory mechanisms in the first 7 days of the experiment and promotes the elimination of circulating immune complexes from the body on the 25th day. Cell therapy in cranio-skeletal injury normalizes content of Ig of A, M and G classes within 14 days of observation with subsequent activation of humoral immune system.

**Key words:** cranio-skeletal injury, humoral immunity, cell therapy.