

УДК 616.71-001-007-092.9-085.849.112:615.835.1:534.222.2:621.374-078-097:611-018.54:612.017.1

ГЕРЦЕН Г.И.¹, СЕ-ФЕЙ¹, ОСТАПЧУК Р.Н.¹, ЛЕСОВОЙ А.В.², ГАПОН А.Н.², КОСТЕНКО А.В.³, ЖЕРЕБЧУК В.В.

¹Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика, г. Киев, Украина

²Городская клиническая больница № 6, г. Киев, Украина

³Городская клиническая больница № 8, г. Киев, Украина

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ИММУННЫХ КЛЕТОК СЫВОРОТКИ КРОВИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ УДАРНО-ВОЛНОВОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДЕФЕКТЕ КОСТИ

Резюме. В иммунологических исследованиях на 40 кроликах изучено влияние экстракорпоральной ударно-волновой терапии на активность иммунных клеток сыворотки крови в динамике до и после экспериментальной травмы — дефекта большеберцовой кости. При этом в сыворотке крови определяли уровень цитотоксической активности лимфоцитов/макрофагов, потенцирование аутологической сывороткой крови цитотоксической активности лимфоцитов и макрофагов (индекс модуляции), цитотоксическую активность сыворотки крови, уровень среднемолекулярных циркулирующих иммунных комплексов. Динамика выполненных иммунологических исследований показала, что у животных на 2-й день после травмы большеберцовой кости отмечается частичный паралич функциональной активности иммунных клеток сыворотки крови (фаза истощения). В дальнейшем, через 15–45 дней, в сыворотке крови кроликов постепенно восстанавливается активность иммунных клеток, хотя к концу наблюдения (45-й день) у животных контрольной группы (не получавших экстракорпоральную ударно-волновую терапию) полного восстановления активности не наблюдалось. В опытной группе под влиянием экстракорпоральной ударно-волновой терапии восстановление активности иммунных клеток сыворотки крови происходило более интенсивно, к концу наблюдения (45-й день) она не только нормализовалась, но и достоверно превышала норму.

Ключевые слова: иммунные клетки, ударно-волновая терапия.

Введение

В литературе имеются работы, свидетельствующие об эффективности фокусированной и радиальной экстракорпоральной ударно-волновой терапии (ЭУВТ) при лечении свежих переломов и псевдоартрозов. Если при свежих переломах влияние радиальной ЭУВТ связывают с индукцией стволовых мезенхимальных клеток костного мозга [2, 11], то при псевдоартрозах эффект фокусированной ЭУВТ обусловлен микроповреждениями межотломковых тканей с последующей пролиферацией остеοидных клеток [4, 8]. Сведения о механизме влияния радиальной ЭУВТ на костеобразовательные процессы при свежих переломах не всегда однозначны, порой противоречивы [3, 7]. Одним из факторов воздействия ЭУВТ на репаративный остеогенез является индукция функциональной активности иммунокомпетентных клеток [5, 6]. В ряде работ было показано, что в условиях экспериментальной травмы кости под

влиянием радиальной ЭУВТ у животных наблюдается формирование костной мозоли с большим количеством ангиогенных и остеогенных маркеров роста (иммуногистохимически), со значительным числом костных перекладин (морфологически) и более высокими прогностическими характеристиками (биомеханически) [9, 10].

Целью настоящего исследования было изучение влияния ЭУВТ на активность иммунных клеток сыворотки крови (СК) кроликов в динамике до и после экспериментальной травмы большеберцовой кости.

Адрес для переписки с авторами:

Герцен Г.И.

E-mail: orthotrauma1@gmail.com

© Герцен Г.И., Се-Фей, Остапчук Р.Н., Лесовой А.В.,

Гапон А.Н., Костенко А.В., Жеребчук В.В., 2016

© «Травма», 2016

© Заславский А.Ю., 2016

Материал и методы

Иммунологические исследования проведены на 40 взрослых кроликах-самцах массой от 2,9 до 3,4 кг, которые составили контрольную ($n = 20$) и опытную ($n = 20$) группы. У животных применена стандартная модель сквозного дырчатого дефекта проксимального метадиафиза большеберцовой кости во фронтальной плоскости диаметром 2,5 мм.

В опытную группу наблюдений взяты животные, у которых в отличие от контрольных после получения дефекта кости на участок травмы влияли радиальной ЭУВТ. Нами использован аппарат для радиальной ЭУВТ фирмы Storz Medical (Швейцария), модель Masterpuls MP200. Частота ударов составляла 1–21 Гц, рабочее давление — 1–5 бар. Лечебное действие осуществляли при общем количестве ударов на участок дефекта костной ткани за одну процедуру, равном 2 тыс., максимальной энергии 0,48 мДж/мм². Общее число лечебных сеансов на курс — 4, интервал между процедурами — 4 суток.

Во время эксперимента животных содержали в виварии в соответствии с требованиями международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes: Council of Europe 18.03.1986. — Strasburg, 1986. — 52 p.).

На каждый срок наблюдения (до и спустя 2, 15, 30, 45 дней после травмы) в обеих группах животных взято по 5 кроликов. В приведенные сроки у животных брали кровь из ушной вены (3–4 мл). Исследование функциональной активности иммунных клеток СК проводили с помощью ММТ-теста по методике Т.Р. Stanojkovic et al. [12] в модификации О.С. Дворщенко с соавт. [1]. При этом изучали: уровень цитотоксической активности лимфоцитов/макрофагов (ЦТА Лц/Мф), потенцирование аутологической СК цитотоксической актив-

ности лимфоцитов и макрофагов (индекс модуляции), цитотоксическую активность СК, уровень среднемолекулярных циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Иммунологические исследования выполнены в лаборатории иммуномодуляторов ИЭПОР имени Р.Е. Кавецкого НАН Украины, консультация проф. Г.П. Потебни.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью общепринятых методов вариационной статистики. Вероятность разницы между измерениями оценивали по t-критерию Стьюдента. Вероятность считали разницу между сравниваемыми показателями при $p < 0,05$. Расчеты и построение графиков выполняли с использованием прикладной программы OriginLab.

Результаты

При исследовании ЦТА Лц было установлено, что травма большеберцовой кости приводит к резкому снижению на 2-й день этого показателя в СК кроликов как контрольной (с $43,81 \pm 1,22$ % в начале эксперимента до $3,64 \pm 0,77$ %), так и опытной группы (с $41,65 \pm 1,31$ % до $2,82 \pm 0,08$ %), при $p < 0,001$ в обеих группах животных (рис. 1).

При этом не установлено достоверных отличий приведенных показателей между контрольной и опытной группами кроликов как на начало эксперимента, так и на 2-й день после травмы кости ($p > 0,05$). На 15-й и 30-й день после травмы активность лимфоцитов в СК у кроликов обеих групп восстанавливалась и составляла: в контрольной группе — $18,71 \pm 8,43$ % и $36,18 \pm 1,50$ % соответственно, в опытной — $27,43 \pm 6,15$ % и $42,74 \pm 8,27$ %, $p < 0,01$ при сравнении с предыдущими сроками и между двумя группами. На 45-й день ЦТА Лц у кроликов контрольной группы хотя и продолжала возрастать, но находилась ниже исходных показателей — $39,15 \pm 11,56$ % ($p < 0,05$), в то же время в

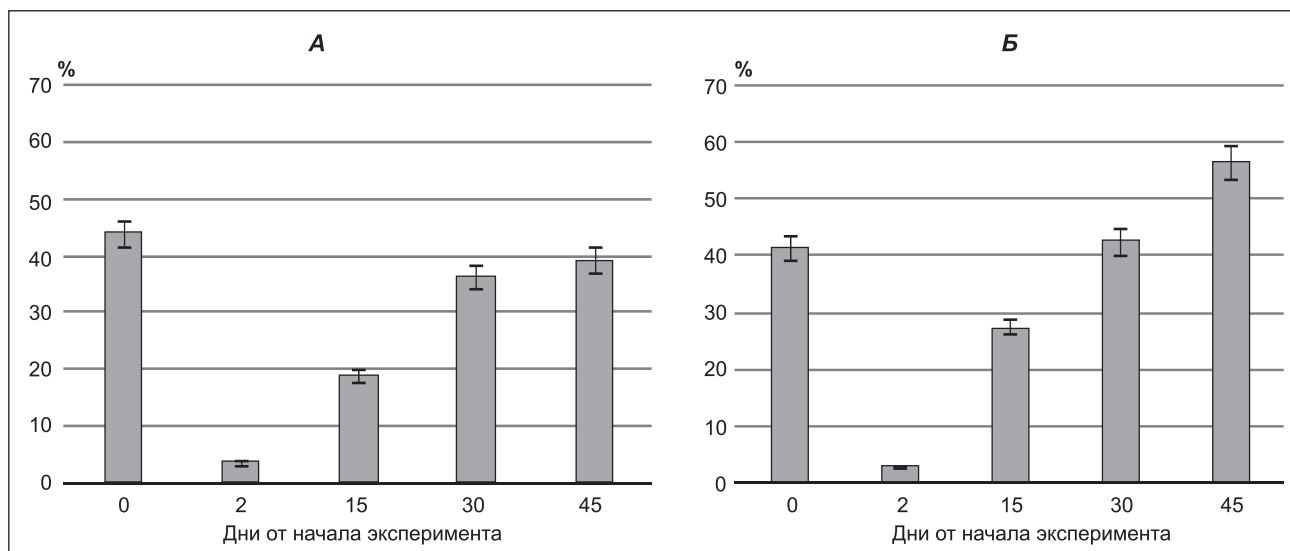


Рисунок 1. ЦТА Лц СК у кроликов контрольной (А) и опытной (Б) групп после травмы кости

опытной группе она была выше начального уровня — $56,80 \pm 3,03 \%$ ($p < 0,02$).

Исследование ЦТА Мф показало снижение их активности в СК на 2-й и 15-й дни после травмы кости в обеих группах животных. Эти показатели в отмеченные сроки составляли $11,61 \pm 1,09 \%$ и $9,88 \pm 5,38 \%$ соответственно у кроликов контрольной группы; $12,80 \pm 2,16 \%$ и $16,01 \pm 4,32 \%$ — опытной (рис. 2), при $p < 0,001$ в обеих группах животных в сравнении с исходными показателями. На 30-й день уровень функциональной активности макрофагов в СК приближался к исходному ($20,69 \pm 1,68 \%$) и составлял $18,65 \pm 0,00 \%$ (при $p < 0,05$).

В то же время этот показатель у кроликов опытной группы существенно превышал исходные данные ($21,64 \pm 5,07 \%$), достигая $27,71 \pm 5,09 \%$ ($p < 0,02$). На 45-й день уровень ЦТА Мф в контрольной группе достоверно не отличался от норматива и составлял $22,50 \pm 2,63 \%$ ($p > 0,05$); в опытной — резко возрастал, составляя $45,93 \pm 1,17 \%$, $p < 0,001$ в сравнении с нормой.

У кроликов обеих групп при исследовании индекса модуляции получены следующие данные: на 2-й день

после травмы кости у животных контрольной группы индекс модуляции лимфоцитов резко возрастал от 23,48 до 615,62 % ($p < 0,001$), уровень макрофагов — соответственно от $-1,22$ до 12,49 % ($p < 0,001$); в опытной группе индекс модуляции лимфоцитов возрастал от 20,57 до 572,34 % ($p < 0,001$), макрофагов — с 1,86 до 10,94 % ($p < 0,001$), что отражено в табл. 1. На 15, 30 и 45-й день после травмы кости у животных контрольной группы отмечалась сниженная клеточная активность как лимфоцитов в СК при умеренном возрастании соответственно до 6,41; 6,72; 8,11 %, так и макрофагов — $-18,49$; $-17,15$; $-8,88 \%$, при $p < 0,001$ в сравнении с исходным уровнем.

В эти же сроки у опытных животных СК стимулировала цитотоксическую активность лейкоцитов — до 16,11; 19,29; 21,99 % соответственно и макрофагов — до 5,49; 3,15 и 2,54 %, $p < 0,05$ при сравнении показателей обеих групп кроликов.

При исследовании ЦТА СК отмечали достоверное возрастание этого показателя на 2-й день после травмы у животных как контрольной — до $19,44 \pm 3,86 \%$ (исходно $12,29 \pm 2,16 \%$), так и опытной группы — до

Таблица 1. Потенцирование аутологической СК цитотоксической активности лимфоцитов и макрофагов после травмы кости (индекс модуляции, %)

Срок от начала эксперимента, дней	Контрольные животные		Опытные животные	
	Лимфоциты	Макрофаги	Лимфоциты	Макрофаги
0 (до начала опыта)	23,48	-1,22	20,57	-1,86
2	615,62*	12,49*	572,34*	10,94*
15	6,41*	-18,49*	16,11*	5,49*
30	6,72*	-17,15*	19,29**	3,15**
45	8,11*	-8,88*	21,99**	2,54**

Примечания: * — показатели, которые достоверно отличаются от исходного уровня; ** — показатели, не имеющие достоверных различий с начальным уровнем.

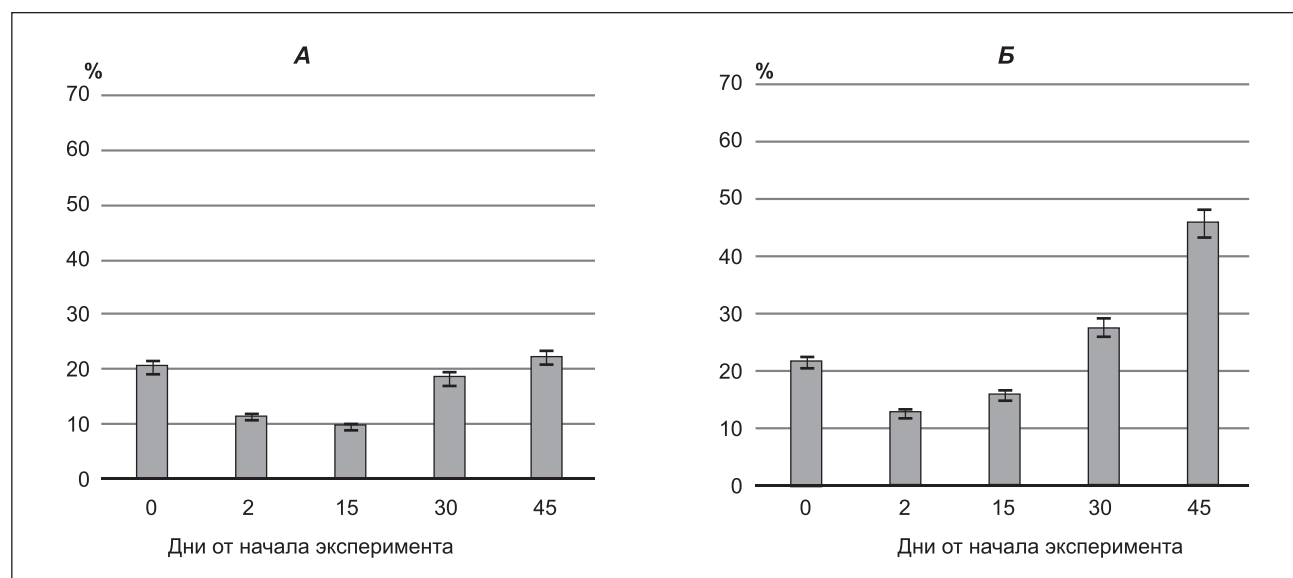


Рисунок 2. ЦТА Мф СК у животных контрольной (А) и опытной (Б) групп после травмы кости

17,59 ± 3,72 % (исходный уровень — 10,92 ± 2,45 %), при $p < 0,001$ в обеих группах кроликов (рис. 3).

Наоборот, на 15-й и 30-й день после травмы кости констатируется значительное снижение этого показателя: в контрольной группе — с 17,15 ± 4,92 % до -4,18 ± 1,32 %, в опытной — с 13,29 ± 2,30 % до 3,14 ± 1,12 %. На 45-й день у кроликов контрольной группы цитотоксичность СК составляла 10,32 ± 2,25 %, не отличаясь достоверно от исходного уровня ($p > 0,05$), а у животных опытной группы этот показатель существенно превышал начальный, достигая 34,64 ± 2,67 % ($p < 0,001$).

При анализе уровня среднемoleкулярных ЦИК в СК животных контрольной группы отмечено его возрастание ко 2-му и 15-му дням после травмы — до 0,230 ± 0,005 опт.ед. и 0,240 ± 0,016 опт.ед. соответственно по сравнению с 0,009 ± 0,001 опт.ед. (исначально), $p < 0,001$; в СК кроликов опытной группы эти показатели составляли 0,230 ± 0,012 опт.ед. и 0,185 ± 0,014 опт.ед. (исходно 0,011 ± 0,006 опт.ед.), $p < 0,001$ (рис. 4).

На 30-й и 45-й день уровень среднемoleкулярных ЦИК в СК животных контрольной группы снижался и составлял соответственно 0,150 ± 0,012 опт.ед. и

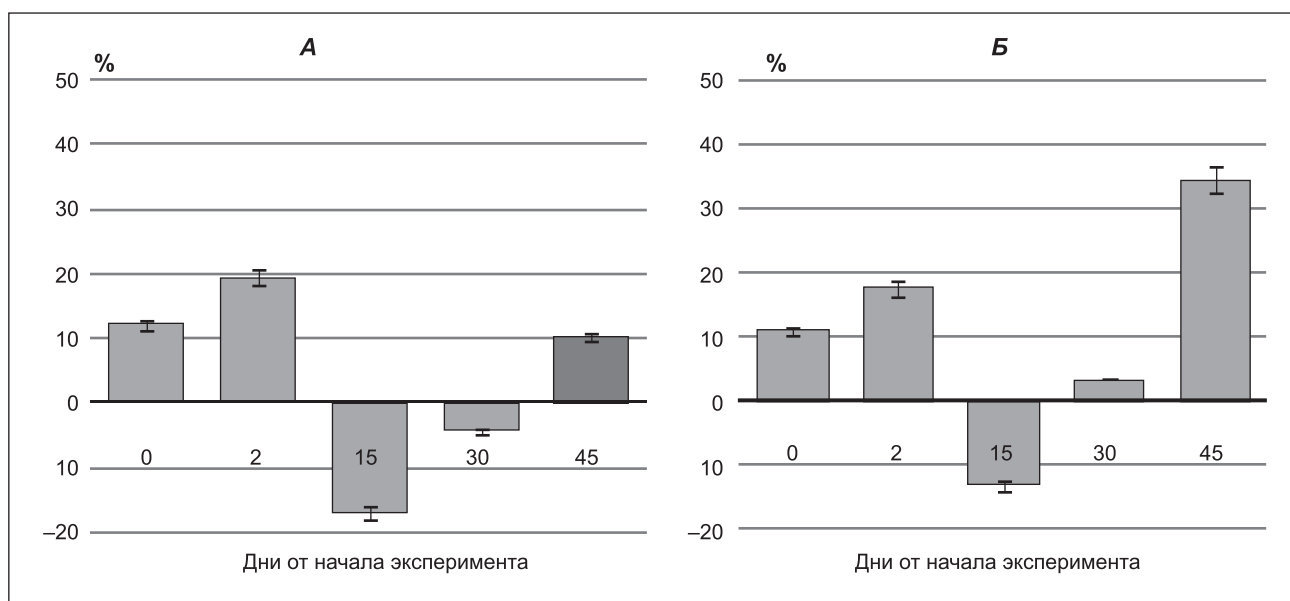


Рисунок 3. Цитотоксическая активность СК у кроликов контрольной (А) и опытной (Б) групп после травмы кости

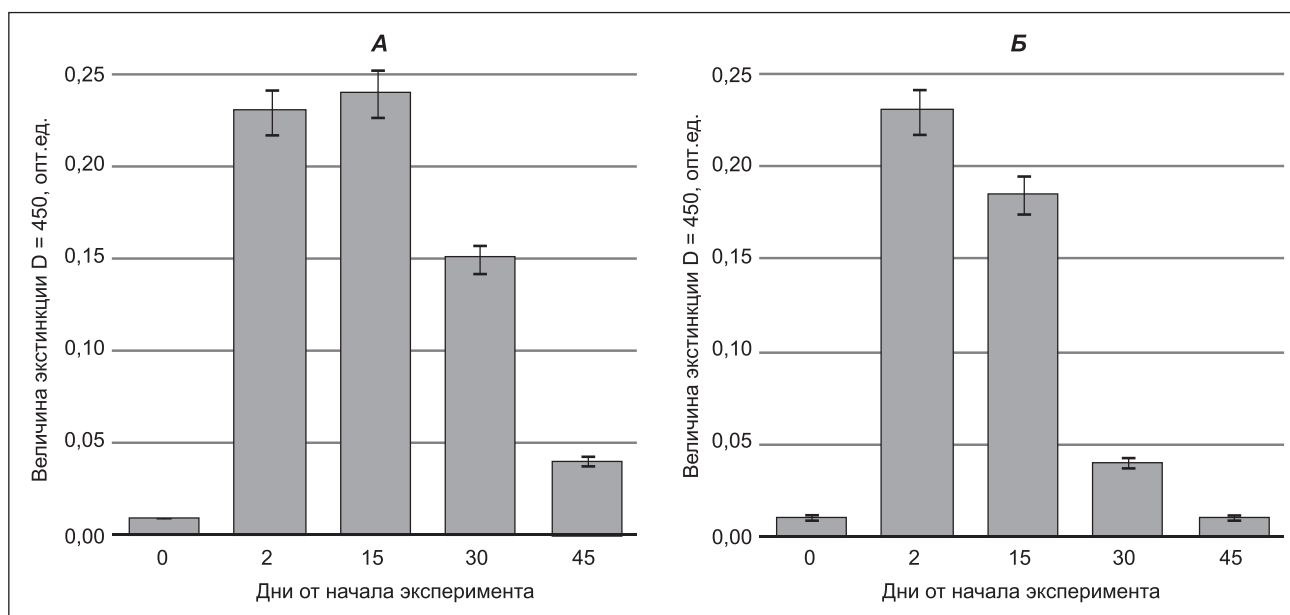


Рисунок 4. Уровень среднемoleкулярных ЦИК в СК у животных контрольной (А) и опытной (Б) групп после травмы кости

0,04 ± 0,02 опт.ед., хотя достоверно превышал показатели нормы при $p < 0,001$; в опытной группе эти показатели составляли 0,040 ± 0,001 опт.ед. и 0,011 ± 0,004 опт.ед., что отвечало норме ($p > 0,05$).

Обсуждение

В выполненной и опубликованной нами ранее работе было отмечено, что радиальная ЭУВТ активирует сращение экспериментального дефекта большеберцовой кости у кроликов. При этом со стороны капилляров и синусоидов костного мозга области травмы кости отмечается вазодилатация, повышается проницаемость стенок сосудов, возникает диффузная инфильтрация костного мозга клетками крови, что приводит к индуцированию эндостального костеобразования [7].

В настоящей работе показано, что при травме кости ЭУВТ существенно влияет на активность иммунных маркеров СК. Так, в ранние сроки (2-й день после травмы) резко снижается функциональная активность лимфоцитов и макрофагов СК, что, по нашему мнению, обусловлено общей метаболической реакцией организма на травму. В это же время возрастает индекс модуляции отмеченных иммунных маркеров за счет иммуностимулирующего действия гуморальных факторов СК. На 2–15-й дни после травмы в СК животных возрастает уровень ЦИК, а на 15–30-й — снижается цитотоксическая активность СК, что отражает накопление в СК воспалительных цитокинов, стимулирующих пролиферацию клеток-мишеней. Динамика этих показателей типична для асептического воспалительного процесса, наблюдающегося при сращении переломов костей.

В целом, оценивая активность иммунных маркеров СК, следует отметить, что после экспериментальной травмы большеберцовой кости у животных наблюдается частичный паралич функциональной активности иммунных клеток СК (фаза истощения), активность которых в динамике исследования постепенно нормализуется (фаза восстановления). Однако к концу эксперимента (45-й день) полного восстановления активности иммунных клеток СК в контрольной группе не наблюдалось. В то же время в СК кроликов опытной группы после 4 сеансов ЭУВТ была констатирована не только их нормализация, но и повышенная активность.

Полученные нами данные совпадают с результатами других экспериментальных исследований. Так, ряд авторов отметили, что ЭУВТ при экспериментальных переломах и травматических дефектах костей способствует возрастанию содержания в СК и тканях костного регенерата иммунных ангиогенных и остеогенных факторов роста — неоваскулярных иммунопозитивных клеток, костного морфогенетического протеина, антипролиферационного клеточного ядерного антигена [8, 9]. Повышение содержания указанных иммунных маркеров сопровождалось более интенсивным (в сравнении с контролем) течением процессов хондрогенеза и остеогенеза.

Выводы

1. В экспериментальных исследованиях показано, что после травмы большеберцовой кости (травматический дефект) у кроликов достоверно снижаются функциональная активность лимфоцитов и макрофагов сыворотки крови, цитотоксическая активность сыворотки крови, возрастают индекс модуляции лимфоцитов и макрофагов, уровень циркулирующих иммунных комплексов (фаза истощения), что свидетельствует о частичном параличе функциональной активности отмеченных иммунных маркеров.

2. В динамике наблюдения установлено, что вслед за фазой истощения наступает фаза восстановления функциональной активности иммунных клеток сыворотки крови, однако к концу наблюдения (45-й день после травмы) полного восстановления их функциональной активности у животных контрольной группы не было, тогда как в опытной группе после 4 сеансов ЭУВТ иммунные маркеры не только достигали исходных величин, но и достоверно их превышали.

Список литературы

1. *Моделювання ксеногенних клітинних систем на твердих фазах з використанням пухлиноасоційованих та ембріональних антигенів / О.С. Дворченко, Г.В. Діденко, М.Г. Чередарчук [та ін.] // Доповіді НАН України. — 2007. — № 12. — С. 155-161.*
2. *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.*
3. *Левенец В.М. Ударно-хвильова терапія в ортопедії і оперативній медицині / В.М. Левенец, М.М. Риган. — К.: Фенікс, 2012. — 155 с.*
4. *Левенец В.М. Ударно-хвильова терапія в лікуванні несправжніх суглобів / В.М. Левенец, М.М. Риган, А.О. Веремій // Спортивна медицина. — 2013. — № 1. — С. 17-21.*
5. *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.*
6. *Се-Фей. Експериментальне дослідження впливу екстракорпоральної радіальної ударно-хвильової терапії на імунні маркери сироватки крові у кроликів з травмою кістки / Се-Фей // Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П.Л. Шупика. — К., 2015. — Вип. 24, кн. 2. — С. 329-335.*
7. *Се-Фей. Експериментальні морфологічні дослідження впливу екстракорпоральної радіальної ударно-хвильової терапії на репаративну регенерацію кісткової тканини / Се-Фей // Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П.Л. Шупика. — К., 2015. — Вип. 24, кн. 3. — С. 63-69.*
8. *Effects of Extracorporeal Shock Wave Therapy on Fracture nonunions / M. Chiara, M. Vetrano, F. Conforti [et al.] //*

- The American Journal of Orthopedics*. — 2012. — 41(9). — P. 122-127.
9. *Biological effects of extracorporeal shockwave in bone healing: a study in rabbits* / Ching-Jen Wang, Feng-Sheng Wang, Kuender D. Yang [et al.] // *Arch. Orthop. Trauma Surg.* — 2008. — 128(8). — P. 124-132.
10. Ching-Jen Wang. *Extracorporeal Shock wave therapy in musculoskeletal disorders* / Ching-Jen Wang // *Journal of Orthop. Surgery and Research*. — 2012. — Vol. 7. — P. 11-15.
11. Czarnovska M. *Predictive role of scintigraphy (BS) in bone union induction using extracorporeal shock wave treatment (ESWT)* / Czarnovska M. // *J. Orthop.* — 2013. — Vol. 10(2). — P. 70-73.
12. *The antitumor immune response in HER-2 positive, metastatic breast cancer patients* / T.P. Stanojkovic, Z. Zizak, T. Svalic [et al.] // *Transpl. Med.* — 2005. — № 3. — P. 13-18.

Получено 17.02.16 ■

Герцен Г.І.¹, Се-Фей¹, Остапчук Р.М.¹, Лісовий О.В.², Гапон А.Н.², Костенко А.В.³, Жеребчук В.В.³

¹Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, м. Київ, Україна

²Міська клінічна лікарня № 6, м. Київ, Україна

³Міська клінічна лікарня № 8, м. Київ, Україна

ДИНАМІКА АКТИВНОСТІ ІМУННИХ КЛІТИН СИРОВАТКИ КРОВІ ПІД ВПЛИВОМ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОЇ УДАРНО-ХВИЛЬОВОЇ ТЕРАПІЇ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ УШКОДЖЕННІ КІСТКИ

Резюме. В імунологічних дослідженнях на 40 кроликів вивчено вплив екстракорпоральної ударно-хвильової терапії на активність імунних клітин сироватки крові в динаміці до і після експериментальної травми — дефекту великогомілкової кістки. При цьому в сироватці крові визначали рівень цитотоксичної активності лімфоцитів/макрофагів, потенціювання автологічною сироваткою крові цитотоксичної активності лімфоцитів і макрофагів (індекс модуляції), цитотоксичну активність сироватки крові, рівень середньомолекулярних циркулюючих імунних комплексів. Динаміка виконаних імунологічних досліджень показала, що у тварин на 2-й день після травми великогомілкової кістки відзначається частковий параліч функціональної активності імунних клітин сироватки крові (фаза виснаження). Надалі, через 15–45 днів, у сироватці крові кроликів поступово відновлюється активність імунних клітин, хоча до кінця спостереження (45-й день) у тварин контрольної групи (які не отримували екстракорпоральної ударно-хвильової терапії) повного відновлення активності не спостерігалось. У дослідній групі під впливом екстракорпоральної ударно-хвильової терапії відновлення активності імунних клітин сироватки крові відбувалося більш інтенсивно, до кінця спостереження (45-й день) вона не тільки нормалізувалася, але й вірогідно перевищувала норму.

Ключові слова: імунні клітини, ударно-хвильова терапія.

Hertsen H.I.¹, Xie Fei¹, Ostapchuk R.M.¹, Lisovyi O.V.², Hapon A.N.², Kostenko A.V.³, Zhrebchuk V.V.³

¹National Medical Academy of Postgraduate Education named after P.L. Shupyk, Kyiv, Ukraine

²City Clinical Hospital № 6, Kyiv, Ukraine

³City Clinical Hospital № 8, Kyiv, Ukraine

THE DYNAMICS OF THE ACTIVITY OF SERUM IMMUNE CELLS UNDER THE INFLUENCE OF EXTRACORPOREAL SHOCK WAVE THERAPY IN EXPERIMENTAL BONE DEFECT

Summary. The immunological studies of 40 rabbits showed the effect of extracorporeal shock wave therapy on the activity of serum immune cells in the dynamics before and after the experimental injury — a tibial defect. In the blood serum, we have determined the level of cytotoxic activity of lymphocytes/macrophages, potentiation of the cytotoxic activity of lymphocytes and macrophages (modulation index) by autologous serum, the cytotoxic activity of the blood serum, the level of circulating immune complexes with medium molecular weight. Dynamics of immunological studies showed that animals had a partial paralysis of the functional activity of serum immune cells (depletion phase) on the 2nd day after the tibial injury. Later, in 15–45 days, immune serum cells of rabbits gradually restored their activity, but by end of follow-up (day 45) in animals from the control group (who were not treated with extracorporeal shock wave therapy), full recovery of activity was not observed. In the experimental group under the influence of extracorporeal shock wave therapy, restoration of serum immune cells activity occurred more rapidly, by the end of the study (day 45) it was not only normal, but also was significantly higher than the norm.

Key words: immune cells, shock wave therapy.