

**ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ДИСТРЕСС ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ
В СОЧЕТАНИИ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ****Тернопольский государственный медицинский университет****им. И. Я. Горбачевского (Тернополь)**

Работа является фрагментом научно-исследовательской работы «Медицинские закономерности и информационные модели течения патологических процессов при различных функциональных условиях и их коррекция», № гос. регистрации 0110U001937.

Вступление. Травма является одной из основных причин смерти населения во всем мире [13]. Смертность, разивающаяся в ранние сроки после тяжелой травмы, как правило, связана с массивным поражением органов, кровотечением, гиповолемией или гипоксией [11, 13]. Если пострадавший пациент выживает после травмы, всегда существует риск развития дисфункции иммунологического гомеостаза, что приводит к появлению синдрома системного воспалительного ответа (ССВО). ССВО, в свою очередь, потенциально опасен для выживших после травмы пациентов вследствие неконтролируемой дисфункции клеток, проявляющейся клинически в виде полиорганной недостаточности (ПОН) [17]. Разнообразные медиаторы (например, окси- и нитро радикалы, протеолитические метаболиты, комплемент, хемокины и цитокины) участвуют в патогенезе ПОН. Про- и противовоспалительные цитокины, такие как TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 и др., вырабатываемые как активированными Т-клетками, так и макрофагами/моноцитами, фактически действуют как гормоны острой фазы или «маркеры опасности» в ответ на инициацию стресса, спровоцированного травмой [13]. В работе [16] было показано, что концентрация цитокинов сыворотки крови обычно соответствует тяжести органной дисфункции.

В последние годы все больше внимания уделяется влиянию сахарного диабета (СД) на течение травматического процесса [9, 15]. Диабет связан с системной воспалительной реакцией и изменением уровня адипокина и кальцитропных гормонов, которые в дальнейшем способствуют патологическим изменениям кости. Гипергликемия, существующая при диабете, влияет на костный матрикс белков, таких как коллаген I посредством неферментативного гликирования. Многочисленными экспериментальными и клиническими исследованиями выяснена роль Т и В-клеточной дисфункции, которая определяет риск развития и прогрессирования системного воспаления у больных сахарным диабетом

[8, 19]. Интерлейкины играют важную роль в регуляции ответа при воспалительном стрессе. Известно, что диабет приводит к нарушениям образования про- и противовоспалительных интерлейкинов [7]. Вероятно, иммунологические нарушения и хроническое воспаление, имеющие место при сахарном диабете, могут ухудшать заживление переломов и увеличить скорость развития травматических осложнений.

На сегодняшний день роль дисбаланса иммунологического гомеостаза в патогенезе травмы в сочетании с сахарным диабетом остается неясной и не до конца изучена. Дальнейшие исследования по определению особенностей иммунного статуса у больных сахарным диабетом, связанных с травмой, послужат основой для терапевтического обоснования вариантов лечения, улучшения здоровья и благополучия пациентов.

Таким образом, **цель исследования** состояла в описании иммунологических изменений и исследовании медиаторов воспалительной иммунной реакции после экспериментальной черепно-мозговой травмы (ЧМТ) в сочетании с сахарным диабетом.

Объект и методы исследования. Эксперименты проводились на 180 белых нелинейных крысах-самцах массой 180–220 г, поделенных на следующие экспериментальные группы: первая – интактные животные (контроль), вторая – крысы, которым моделировали черепно-мозговую травму, третья – крысы с экспериментальным сахарным диабетом, четвертая – животные, которым моделировали ЧМТ на фоне СД. Внутри второй и четвертой групп были выделены четыре подгруппы животных, которых выводили из эксперимента через 3 ч, 24 ч, 5 сут и 14 сут [2]. Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с санитарно-гигиеническими нормами и требованиями GLP [4]. Все этапы экспериментов выполнены согласно международным требованиям о гуманном обращении с животными в соответствии с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, которых используют в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1986).

Экспериментальный СД моделировали однократным введением раствора стрептозотоцина («Sigma», США) в брюшную полость в дозе 60 мг/кг

Таблиця 1

Гуморальний імунітет у крыс з черепно-мозговою травмою, діабетом і черепно-мозговою травмою на фоні діабета ($M \pm m$)

Група		Ig A, г/л n=10	Ig M, г/л n=10	Ig G, г/л n=10	CD-19+, 10 ⁹ /л n=8	CD-19+, % n=8
Контроль		0.23±0.02	0.71±0.06	11.83±1.14	3.14±0.32	31.05±2.14
Діабет		0.33±0.04 *	1.21±0.17 *	16.30±1.05 **	3.09±0.35	29.86±2.93
Животні після травми	3 ч	0.22±0.06	0.64±0.10	11.78±1.08	3.06±0.38	31.30±2.63
	24 ч	0.20±0.02	0.45±0.08 *	6.57±0.72 **	2.33±0.07 *	27.38±1.14
	5 сут	0.24±0.05	0.38±0.07 **	5.97±0.61 ***	2.19±0.15 *	26.42±1.29
	14 сут	0.25±0.03	0.63±0.11	11.20±1.16	3.11±0.20	33.57±3.05
Животні після травми на фоні діабета	3 ч	0.31±0.07	1.07±0.18	16.12±1.37 #	2.75±0.24	28.93±2.25
	24 ч	0.30±0.05	0.35±0.08 ^{^^}	4.68±0.54 ^{^^}	2.04±0.19 [^]	22.15±1.78 [^] #
	5 сут	0.19±0.02 ^{^^}	0.20±0.03 ^{^^} #	4.47±0.35 ^{^^} #	1.28±0.14 ^{^^} ###	17.80±1.32 ^{^^} ###
	14 сут	0.16±0.01 ^{^^} #	0.18±0.04 ^{^^} ##	4.81±0.47 ^{^^} ###	1.25±0.10 ^{^^} ###	18.24±1.53 ^{^^} ###

Примечание: к таблицам 1-3: * – достоверность изменений относительно показателей у интактных животных; # – достоверность изменений относительно показателей у животных с ЧМТ; ^ – достоверность изменений относительно показателей у животных с СД; ** – p<0.05; *** – p<0.01; ### – p<0.001.

[1]. Стрептозотонин растворяли непосредственно перед введением в 0,1 М цитратном буфере (pH 4,5) после 12-часового голодания. Животных брали в эксперимент с уровнем глюкозы более 14 ммоль/л. Закрытую ЧМТ моделировали с помощью разработанной нами методики [3] на 30-е сутки после введения стрептозотонина. Животных выводили из эксперимента в условиях тиопентал-натриевого наркоза (40 мг/кг) путём тотального кровопускания из сердца.

В сыворотке крови оценивали содержание цитокинов TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-10 и основные классы иммуноглобулинов Ig A, M и G методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью диагностической тест-системы фирмы ЗАО «Вектор Бест» (Новосибирск, Россия) на аппарате «Стат Факс Плюс» (Awareness Technology Inc., США) согласно инструкции производителя. Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) в сыворотке крови определяли методом [5], который основывается на разной растворимости мономеров иммуноглобулинов в составе иммунных комплексов при наличии полиэтиленгликоля.

Подсчитывали общее количество Т-лимфоцитов (CD3+), Т-хелперов (CD4+), Т-цитотоксических клеток (CD8+), натуральных киллеров (CD16+, NK) и В-лимфоцитов (CD19+) с помощью поточного люминесцентного цитометра «EPICS XL» (Beckman Coulter, США) и тест-системы «Bioscience, Inc.» (Allentown, PA, США). Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия достоверности Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение. Содержание основных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови крыс в течение всего периода исследования приведено в таблице 1. В соответствии с этими данными, содержание IgA в сыворотке животных после травмы практически не отличается от контроля. Однако отмечается значительное снижение количества IgM и

IgG, более выраженное на 5 сут посттравматического периода – на 46,5 и 49,5% соответственно. Meert et al., 1995 [16] также наблюдал понижение концентрации сывороточного IgG и IgM после черепно-мозговой травмы. Анализ этих показателей на 14 сут эксперимента свидетельствует о приближении их к значениям интактных животных.

Рисунок демонстрирует, что уровень ЦИК у травмированных животных превышает контрольные показатели на 36,5, 60,7 и 23,2% через 24 ч, 5 и 14 сут после ЧМТ соответственно.

ЧМТ сопровождалась некоторым снижением относительного числа CD19+ лимфоцитов, что больше отмечалось на 5-е сут посттравматического периода – на 14,9% по сравнению с контролем (табл. 1). Мы отмечаем положительную корреляцию между концентрацией В-клеток и иммуноглобулинами, которые понижались на протяжении 5 дней после травмы и вернулись к показателям здоровых не травмированных животных (контроль) на 14 день наблюдения (табл. 1). Следует заметить,

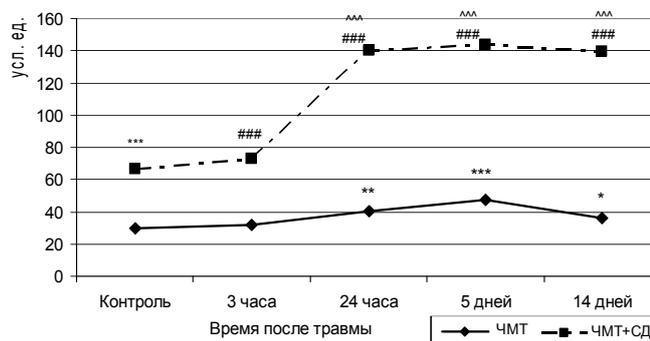


Рис. Динамика содержания циркулирующих иммунных комплексов в крови животных с черепно-мозговой травмой, сахарным диабетом и их сочетанием.

Примечание: * – достоверность изменений относительно показателей у интактных животных; # – достоверность изменений относительно показателей у животных с ЧМТ; ^ – достоверность изменений относительно показателей у животных с СД; * – p<0.05; ** – p<0.01; ### – p<0.001.

Таблиця 2

Содержание цитокинов у животных с черепно-мозговой травмой, сахарным диабетом и черепно-мозговой травмой на фоне диабета ($M \pm m$, $n = 10$)

Группа	Концентрация цитокинов					
	TNF- α , нг/л	IL-1 β , нг/л	IL-2, нг/л	IL-4, нг/л	IL-10, нг/л	
Контроль	41.37 \pm 4.63	13.91 \pm 2.15	9.27 \pm 0.68	25.16 \pm 2.47	10.65 \pm 0.82	
Диабет	116.53 \pm 5.76***	32.75 \pm 3.02***	17.24 \pm 2.15**	14.92 \pm 1.61**	7.11 \pm 0.76**	
Животные после травмы	3 ч	152.48 \pm 7.12***	29.36 \pm 2.82***	14.52 \pm 1.45**	38.41 \pm 3.18**	18.73 \pm 1.84***
	24 ч	186.15 \pm 8.41***	51.63 \pm 3.25***	32.15 \pm 2.27***	52.63 \pm 5.74***	30.87 \pm 2.62***
	5 сут	148.34 \pm 8.82***	46.71 \pm 3.42***	38.54 \pm 3.07***	56.07 \pm 5.58***	28.93 \pm 2.85***
	14 сут	56.52 \pm 5.37*	22.18 \pm 2.06*	17.36 \pm 2.70**	43.52 \pm 4.93**	19.24 \pm 2.41**
Животные после травмы на фоне диабета	3 ч	211.67 \pm 6.82 ^{^^^###}	57.41 \pm 3.18 ^{^^^###}	29.43 \pm 1.94 ^{^^^###}	10.75 \pm 1.53 ^{###}	5.32 \pm 0.32 ^{^###}
	24 ч	234.90 \pm 7.14 ^{^^^###}	70.85 \pm 3.47 ^{^^^###}	34.16 \pm 2.75 ^{^^^}	8.87 \pm 1.50 ^{^###}	4.26 \pm 0.41 ^{^^###}
	5 сут	242.44 \pm 6.95 ^{^^^###}	68.06 \pm 2.93 ^{^^^###}	39.30 \pm 2.64 ^{^^^}	9.11 \pm 1.46 ^{^###}	4.04 \pm 0.28 ^{^^###}
	14 сут	236.63 \pm 6.76 ^{^^^###}	71.31 \pm 3.25 ^{^^^###}	38.21 \pm 2.80 ^{^^^###}	8.72 \pm 0.94 ^{^^###}	4.45 \pm 0.37 ^{^^###}

что концентрация В-лимфоцитов незначительно изменялась в нашем исследовании после нанесения ЧМТ, что совпадает с данными клинических исследований, где концентрация циркулирующих В-клеток остается практически неизменной в течение 18-72 ч после поражения головного мозга [10].

При исследовании содержания разных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови крыс со стрептозотоцин-индуцированным СД определяется статистически достоверно повышенное содержание IgA на 43,5%, IgM – на 70,4% и IgG – на 37,8%. Количество ЦИК также увеличилось на 127,2%. Предложенная модель диабета не сопровождалась достоверными изменениями количества клеток с фенотипом CD19+, что подразумевает большую продуктивность В-клеток без увеличения их количества.

Сравнительный анализ результатов исследования разных часовых диапазонов показал, что моделирование ЧМТ у животных с диабетом вызывает заметные сдвиги в показателях, которые характеризуют гуморальное звено иммунитета (табл. 1). В целом, в то время как концентрация основных классов иммуноглобулинов у животных-диабетиков была выше контрольных показателей, их титр у травмированных крыс с гипергликемией был значительно ниже, чем у посттравматических животных на 5 суток эксперимента (табл. 1). Более того, когда концентрация иммуноглобулинов травмированных крыс полностью вернулась к исходному уровню контроля на 14 день, их количество оставалось аномально низким у животных-диабетиков после ЧМТ (табл. 1). Так, концентрация IgA у этих животных ниже на 20,8 и 36% через 5 и 14 сут после травмы соответственно по сравнению с травмированными животными. Отмечалось также значительное снижение IgM в течение посттравматического периода на 47,4 и 71,4% на 5 и 14 сут соответственно. Концентрация IgG через 3 ч после ЧМТ у крыс-диабетиков оставалась такой же, как на фоне стрептозотоцинового диабета. Однако в дальнейшем она понижалась, особенно через 5 сут – на 72,6% по сравнению с диабетиками. Содержание ЦИК через

24 ч, 5 и 14 сут после травмы на фоне диабета было повышенным, а именно, на 110, 115,3 и 108,9% относительно экспериментального сахарного диабета (рис.).

Комбинирование патологий способствовало более выраженному снижению абсолютного и относительного количества CD19+ лимфоцитов по сравнению как с ЧМТ, так и с СД. Дефицит абсолютного количества CD19+ субпопуляции лимфоцитов составлял 58,6% через 5 дней после травмы и диабета относительно животных-диабетиков, 41,6% относительно травмированных крыс и 59,6% и 59,8% на 14 сут в соответствии с группами сравнения. Аналогичным образом, незначительные изменения концентрации В-клеток были полностью восстановлены у травмированных крыс на 14 сут после травмы и оставались аномально низкими у травмированных животных-диабетиков.

Установлено, что концентрация TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4 и IL-10 постоянно увеличивалась, начиная с первых часов после травмы, и достигая максимума на первые сутки, снижалась. Однако уровень указанных цитокинов не достигал нормы (табл. 2). Так, уровень TNF- α статистически достоверно увеличился в 3,7, 4,5, 3,6 и 1,4 раза соответственно через 3, 24 ч, 5 и 14 сут после травмы, IL-1 β – в 2,1, 3,7, 3,4 и 1,6 раза соответственно, IL-2 – в 1,6, 3,5, 4,2 и 1,9 раза, IL-4 – 1,5, 2, 2,2 и 1,7 раза, IL-10 – 1,8, 2,9, 2,7 и 1,8 раза относительно сроков эксперимента.

Согласно Das et al. (2012), точная функция цитокинов во время травмы мозга до конца не изучена, однако исследования свидетельствуют, что они играют решающую роль в реакции организма на травму головного мозга [10]. Похожее увеличение концентрации некоторых цитокинов после ЧМТ, в том числе TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-18, было обнаружено и другими авторами [18].

В условиях стрептозотоцин-индуцированного диабета отмечался выраженный дисбаланс цитокинов, который состоял в статистически достоверном увеличении TNF- α в 2,8 раза, IL-1 β – в 2,4 раза, IL-2 – в 1,9 раза, но уровень IL-4 уменьшился в 1,7, а IL-10 – в 1,5 раза. Таким образом, можно сделать вывод,

что крысы с диабетом страдают от дисбаланса цитокинов, при котором провоспалительные вещества остаются выше и противовоспалительные вещества – ниже базальных уровней здоровых животных.

Моделирование ЧМТ на фоне экспериментального СД сопровождалось увеличением TNF-α на 38,8% на 3 ч эксперимента по сравнению с животными без СД и превышало на 26,2, 63,4 и 318,7% соответственно через 1, 5 и 14 сут посттравматического периода. Уровень IL-1β возрос на 95,5, 37,2, 45,7 и 221,5% относительно крыс после ЧМТ в соответствии со сроками эксперимента. Отмечалось увеличение IL-2 на 102,7% через 3 ч и на 120% – через 14 сут после травмы относительно показателей у травмированных крыс без СД. Концентрация IL-4 была меньше аналогичных данных при ЧМТ на 72, 83,1, 83,7 и 80% соответственно периодам исследования, а уровень IL-10 меньше на 71,6, 86,2, 86 и 76,9% соответственно.

Следует отметить, что у травмированных крыс, с увеличенными концентрациями про- и противовоспалительных цитокинов, значения последних постепенно возвращаются к уровню неповрежденных животных. Наоборот, травмированные крысы-диабетики характеризуются устойчиво высокими концентрациями провоспалительных цитокинов на 14 сут, в то время как уровень противовоспалительных цитокинов постепенно снижался до значений, которые остаются низкими и на 14 сутки после травмы.

Черепно-мозговая травма, согласно Das et al. (2012), разрушает гематоэнцефалический барьер, что приводит к инфильтрации иммунными клетками головного мозга и последующему воспалению и нейродегенерации, что частично опосредовано провоспалительными цитокинами [10]. Избыточный воспалительный ответ на фоне развития гиперергических клеточных реакций может, в свою очередь, вызывать и усиливать такие процессы, как ишемия и апоптоз.

Моделирование ЧМТ вызывает расстройство и в клеточном звене иммунитета (табл. 3).

Большинство исследователей признает факт снижения количества Т-лимфоцитов в остром периоде после травмы [12]. В данном исследовании отмечалось уменьшение абсолютного и относительного числа Т-лимфоцитов, оцениваемых по маркеру CD3+. Так, определялось снижение абсолютного количества CD3+ на 47,6% через 24 ч и на 46,4% – через 5 сут после травмы. При изучении динамики иммунорегулирующих субпопуляций лимфоцитов (Т-хелперов) установлено статистически достоверное падение содержания CD4+ на 36,3 и 39,3% через 24 ч и 5 сут после ЧМТ соответственно и возвращение их до уровня интактных животных в конце исследования (14 сут). Отмечалась тенденция к уменьшению количества цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+), что было наиболее выраженным между 1 и 5 сут посттравматического периода. Аналогичная динамика установлена в отношении содержания NK клеток (CD16+): на 5 сут посттравматического периода абсолютное количество было снижено на 38,8% по сравнению с контрольными животными.

Известно, что в патогенезе СД и развитии его осложнений важную роль играют иммунопатологические процессы [19]. Стрептозоцин-индуцированный СД сопровождался понижением абсолютного числа CD3+ на 35,6% и их субпопуляций CD4+ и CD8+ на 34,1 и 8,1% соответственно. У животных с гипергликемией отмечалось уменьшение количества естественных киллеров на 34,7%.

При изучении динамики клеточных факторов иммунитета при ЧМТ на фоне СД отмечалась статистически достоверная Т-лимфопения, обусловленная уменьшением обеих субпопуляций, но в большей степени CD4+ (табл. 3). Так, абсолютное количество CD3+ снизилось на 38,5 и 53,8, 67 и 79,4% на 3 и 24 ч, 5 и 14 сут посттравматического периода по сравнению с травмированными животными без диабета. Дефицит субпопуляции CD4+ в данной экспериментальной группе составил 36,4, 55,8, 58,5 и 68,8%, а CD8+ лимфоцитов – 11,4, 38,6, 37 и 54,4% относительно травмированных животных в

Таблица 3

Клеточный иммунитет у животных с черепно-мозговой травмой, сахарным диабетом и сочетанием травмы и диабета (M ± m, n = 8)

Группа	Иммунологические показатели								
	CD3+		CD4+		CD8+		CD16+		
	10 ⁹ /л	%	10 ⁹ /л	%	10 ⁹ /л	%	10 ⁹ /л	%	
Контроль	5.82±0.45	56.58±3.24	1.35±0.10	24.47±1.52	2.23±0.20	33.26±2.35	3.81±0.33	32.60±2.28	
Диабет	3.75±0.38**	48.60±2.60	0.89±0.14*	19.16±1.80*	2.05±0.25	29.80±3.16	2.49±0.27**	23.86±1.92*	
Животные после травмы	3 ч	5.27±0.50	54.42±3.61	1.18±0.12	23.16±2.15	2.19±0.24	33.15±3.46	3.49±0.31	32.05±2.70
	24 ч	3.05±0.42***	45.63±2.17*	0.86±0.04***	20.24±1.23*	1.58±0.14*	28.47±1.93	2.57±0.24**	26.29±1.86
	5 сут	3.12±0.36***	45.78±2.10*	0.82±0.06***	20.15±1.28*	1.62±0.19*	28.64±2.10	2.43±0.26**	24.58±2.08*
	14 сут	5.43±0.48	54.31±3.76	1.28±0.15	23.69±1.36	2.15±0.22	33.21±4.06	3.48±0.42	29.46±1.53
Животные после травмы на фоне диабета	3 ч	3.24±0.30##	44.13±2.85#	0.75±0.08##	17.02±1.37#	1.94±0.22	28.63±1.68	2.51±0.30#	23.67±2.05#
	24 ч	1.41±0.12^^^##	26.42±2.19^^^###	0.38±0.03^^###	14.77±2.82	0.97±0.08^^##	18.92±1.04^^###	1.28±0.13^^###	14.01±1.12^^###
	5 сут	1.03±0.07^^^###	23.18±1.26^^^###	0.34±0.06^^###	14.25±1.02^##	1.02±0.11^^#	18.45±1.17^^###	1.20±0.15^^##	12.96±1.08^^###
	14 сут	1.12±0.09^^^###	24.93±1.15^^^###	0.40±0.03^^###	15.08±1.47###	0.98±0.05^^##	18.67±1.56^^##	1.17±0.21^^###	13.05±1.27^^###

основные сроки исследования. В динамике ЧМТ на фоне СД абсолютное количество CD16+ уменьшалось на 28,1, 50,2, 50,6 и 66,4% по сравнению с II экспериментальной группой.

Наше исследование продемонстрировало, что черепно-мозговая травма в сочетании с сахарным диабетом приводит к более выраженному и длительному ухудшению состояния иммунной системы, по сравнению черепно-мозговой травмой у нормогликемических животных. Гипервоспаление, индуцированное травмой, может привести к повреждению внутренних органов и, как следствие, к полиорганной недостаточности. Одновременно с этим, иммуносупрессия, вызванная травмой, сопровождается повышением риска возникновения посттравматических инфекционных осложнений [14].

Выводы. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что у крыс с индуцированным диабетом и моделированной черепно-мозговой травмой, отмечалось более глубокое

повреждение иммунной системы, состояние которой не восстанавливалось до исходного уровня через 14 дней после травмы. Концентрация провоспалительных цитокинов увеличилась, в то время как количество противовоспалительных цитокинов снижалось в течение исследуемого периода, увеличивая риск развития синдрома системного воспалительного ответа и полиорганной недостаточности. Факторы, ответственные за гуморальный и клеточно-опосредованный иммунитет были существенно ниже на протяжении исследования, что делает крыс с ЧМТ на фоне сахарного диабета более восприимчивыми к инфекции по сравнению с травмированными нормогликемическими животными.

Перспективы дальнейших исследований. В дальнейшей работе предполагается исследовать нарушения энергетического метаболизма во внутренних органах при черепно-мозговой травме на фоне сахарного диабета.

Литература

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / За редакцією: член-кор. АМН України О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.
2. Ельский В. Н. Моделирование черепно-мозговой травмы / В. Н. Ельский, С. В. Зяблицев. – Донецк : Изд-во «Новый мир», 2008. – 140 с.
3. Пат. 74935 Україна, МПК G 09 B 23/28 (2006. 01). Спосіб моделювання черепно-мозкової травми / Мерецький В. М. ; заявник і патентовласник Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського. – №u2012 06594; заявл. 30. 05. 2012; опубл. 12. 11. 2012, Бюл. № 21.
4. Резников О. Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / О. Г. Резников // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142-145.
5. Чернушенко Е. Ф. Иммунологические методы исследований в клинике / Е. Ф. Чернушенко, Л. С. Когосова. – К. : Здоров'я. 1978. – 159 с.
6. Allan S. M. Cytokines and acute neurodegeneration / S. M. Allan, N. J. Rothwell // Nat. Rev. Neurosci. – 2001. – Vol. 2. – P. 734-744.
7. Banerjee M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes / M. Banerjee, M. Saxena // Clin. Chim. Acta. – 2012. – Vol. 413(15-16). – P. 1163-1170.
8. Bending D. Inflammation and type one diabetes / D. Bending, P. Zacccone, A. Cooke // Int. Immunol. – 2012. – Vol. 24(6). – P. 339-346.
9. Claes L. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions / L. Claes, S. Recknagel, A. Ignatius // Nat. Rev. Rheumatol. 2012. – Vol. 8(3). – P. 133-143.
10. Das M. New perspectives on central and peripheral immune responses to acute traumatic brain injury / M. Das, S. Mohapatra, S. S. Mohapatra // Journal of Neuroinflammation. 2012. – Vol. 9. – P. 236.
11. Demetriades D. Trauma fatalities: time and location of hospital deaths/ D. Demetriades, J. Murray, K. Charalambides //J. Am. Coll. Surg. 2004. – Vol. 198. – P. 20–26.
12. Hendrix S. The role of T helper cells in neuroprotection and regeneration/ S. Hendrix, R. Nitsch //Journal of Neuroimmunology. – 2007. – Vol. 184(1–2). – P. 100–112.
13. Lenz A. Systemic inflammation after trauma/ A. Lenz, G. A. Franklin, W. G. Cheadle //Injury, Int. J. Care Injured. – 2007. – Vol. 38. – P. 1336–1345.
14. Lenzlinger P. M. The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury / P. M. Lenzlinger, M. C. Morganti-Kossmann, H. L. Laurer, T. K. McIntosh //Mol. Neurobiol. – 2001. – Vol. 24. – P. 169-181.
15. McCabe L. Understanding the skeletal pathology of type 1 and 2 diabetes mellitus/ L. McCabe, J. Zhang, S. Raehtz // Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr. – 2011. – Vol. 21(2). – P. 187-206.
16. Meert K. L. Alterations in immune function following head injury in children/ K. L. Meert, M. Long, J. Kaplan, A. P. Sarnaik // Crit. Care Med. – 1995. – Vol. 23. – P. 822-828.
17. Osborn T. M. Epidemiology of sepsis in patients with traumatic injury/ T. M. Osborn, J. K. Tracy, J. R. Dunne [et al.]//Crit. Care Med. – 2004. – Vol. 32. – P. 2234–2240.
18. Smrcka M., Mrlan A., Karlsson-Valik J., Klabusay M. The effect of head injury upon the immune system/ M. Smrcka, A. Mrlan, J. Karlsson-Valik, M. Klabusay //Bratisl. Lek. Listy. – 2007. – Vol. 108(3). – P. 144-148.
19. Ting C. Impairment of immune systems in diabetes/ C. Ting, V. Bansal, I. Batal [et al.] //Adv. Exp. Med. Biol. – 2012. – Vol. 771. – P. 62-75.

УДК 616.379-008.64-06:616.831-001.3-092.19]-092.9

ІМУНОЛОГІЧНИЙ ДИСТРЕС ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВІЙ ТРАВМІ В ПОЄДНАННІ З ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

Мерецький В. М.

Резюме. У статті проведено дослідження імунного статусу після експериментальної черепно-мозкової травми в поєднанні з цукровим діабетом. Було показано, що у щурів з індукованим діабетом і модельованою черепно-мозковою травмою, відзначалося більш глибоке ушкодження імунної системи, стан якої не відновлювався до вихідного рівня через 14 днів після травми. Концентрація прозапальних цитокінів збільшувалась, в той час як кількість протизапальних цитокінів знижувалась протягом досліджуваного періоду, збільшуючи ризик розвитку синдрому системної запальної відповіді та поліорганної недостатності. Фактори, відповідальні за гуморальний і клітинно-опосередкований імунітет, були істотно нижчими протягом дослідження, що робить щурів з черепно-мозковою травмою на фоні цукрового діабету більш сприйнятливими до інфекції в порівнянні з нормоглікемічними травмованими тваринами.

Ключові слова: черепно-мозкова травма, цукровий діабет, клітинний імунітет, імуноглобуліни, цитокіни.

УДК 616.379-008.64-06:616.831-001.3-092.19]-092.9

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ДИСТРЕСС ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ В СОЧЕТАНИИ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Мерецкий В. Н.

Резюме. В статье проведено исследование иммунного статуса после экспериментальной черепно-мозговой травмы в сочетании с сахарным диабетом. Было показано, что у крыс индуцированным диабетом и моделированной черепно-мозговой травмой, отмечалось более глубокое повреждение иммунной системы, состояние которой не восстанавливалось до исходного уровня через 14 дней после травмы. Концентрация провоспалительных цитокинов увеличилась, в то время как количество противовоспалительных цитокинов снижалось в течение исследуемого периода, увеличивая риск развития синдрома системного воспалительного ответа и полиорганной недостаточности. Факторы, ответственные за гуморальный и клеточно-опосредованный иммунитет были существенно ниже на протяжении исследования, что делает крыс с черепно-мозговой травмой на фоне сахарного диабета более восприимчивыми к инфекции по сравнению с травмированными нормогликемическими животными.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, сахарный диабет, клеточный иммунитет, иммуноглобулины, цитокины.

UDC 616.379-008.64-06:616.831-001.3-092.19]-092.9

Immunological Distress in Traumatic Cranial Injury Associated with Diabetes

Meretsky V. M.

Summary. Trauma is one of the main causes of death in the general public worldwide. Mortality occurring early after major trauma is usually due to massive organ injury, bleeding, hypovolaemia or hypoxia. If the injured patient survives after severe trauma, there is always a risk of the immunological dys-homeostasis development which leads to systemic inflammatory response syndrome. In recent years, increased emphasis has been placed on the impact of diabetes mellitus on the course of traumatic process. Diabetes is associated with enhanced inflammation and altered adipokine and calcitrophic hormone levels, which further contribute to bone pathophysiology. Diabetes has been recognized as the disease leading to disturbances in the production of pro- and anti-inflammatory interleukins. It is logically to expect that immunological disorders and extensive inflammation, as observed in diabetes mellitus, can deteriorate fracture healing and increase the rate of trauma complications.

The article is devoted to study of the immune status after experimental traumatic brain injury in combination with streptozotocin diabetes.

Experiments were carried out on 100 male white rats that were divided into the following groups: the first group – control group consisted of 10 intact animals, the second group (n=40) – rats with simulated traumatic cranial injury, the third group (n=10) – rats with experimental diabetes mellitus, the fourth group (n=40) – rats with simulated traumatic cranial injury and experimental diabetes mellitus. Experimental diabetes was induced by a single streptozotocin solution intraperitoneal injection. Animals were withdrawn from the experiment at 3, 24 hours, 5 and 14 days after the traumatic cranial injury. Blood of the experimental animals was analyzed for the cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10), as well as the major classes of immunoglobulins (IgA, IgM, and IgG), using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. Circulating immune complexes were studied by precipitation of sera with polyethylene glycol. Total T lymphocytes (CD3+), helper T cells (CD4+), cytotoxic T lymphocytes (CD8+), natural killer cells (CD16+), and B lymphocytes (CD19+) in blood were identified using flow cytometry method. Multiple comparisons were evaluated using one-way analysis of variance followed by the Student's t-test.

It was shown a decrease in serum IgG and IgM concentrations following brain injury. Concentration of all major immunoglobulins in injured diabetes-induced animals decreased to a greater extent compared to post-traumatic

control animals. Moreover, such concentrations remained abnormally low in post-traumatic diabetes-induced animals on day 14. It was established that TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, and IL-10 concentrations gradually increased over the first hours after the injury and reached maximum values within 1 to 14 days. Contrary, injured rats-diabetics sustained high concentration of proinflammatory cytokines on day 14, while anti-inflammatory cytokines levels consistently decreased with values being abnormally low even on day 14 post-trauma. Concentration of cells responsible for cellular arm of immunity returned to their normal levels by day 14 in case of cranial injury alone, while rats-diabetics with the same injury suffered decreased concentration of T-lymphocytes and NK cells even on day 14 post-trauma.

It was shown that rats with induced diabetes and traumatic cranial injury suffered more profound damage to the immune system that was not restored back to the normal basal level after 14 days. Proinflammatory cytokine concentrations increased, while anti-inflammatory cytokine concentrations decreased during the studied period, increasing risk for systemic inflammatory response syndrome and multi-organ failure. Factors responsible for humoral immunity and cell-mediated immunity were consistently lower throughout day 14, which might make injured diabetic rats more susceptible to infections compared to rats with brain injury alone.

Key words: traumatic cranial injury, diabetes mellitus, cellular immunity, immunoglobulins, cytokines.

Рецензент – проф. Корда М. М.

Стаття надійшла 9. 08. 2013 р.