

СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ТРАВМАХ У НЕАДАПТИРОВАННЫХ К УСЛОВИЯМ ВЫСОКОГОРЬЯ ЖИВОТНЫХ

Джумабеков С.А., Исаков Б.Д., Нурудин У.Б., Шералиев А.А.

Бишкекский научно-исследовательский центр травматологии и ортопедии Министерства здравоохранения Кыргызской Республики, Бишкек, e-mail: bnicto@dz.gov.kg

Гомеостатические показатели любого организма находятся в тесной зависимости от условий, в которых находится данный организм. Показатели иммунной системы считаются весьма лабильными и даже в состоянии относительного физиологического покоя претерпевают незначительные колебания, не говоря об их изменениях при воздействии на организм болевого раздражения и горных факторов. Исходя из этого целью настоящего исследования явилось изучение особенностей клеточного иммунитета при травмах в условиях высокогорья на разных сроках пребывания у адаптированных и неадаптированных к условиям высокогорья экспериментальных животных. Исследования были проведены нами на 140 белых лабораторных крысах обоего пола на высоте 3200 метров над уровнем моря в условиях высокогорной базы Тоо-Ашуу. У животных контрольной группы к концу эксперимента концентрации основных субпопуляций лимфоцитов возвращаются к исходным значениям, в то время как у животных основной группы к концу исследования эти данные остаются достоверно повышенными. У неадаптированных к условиям высокогорья животных было установлено, что при травмах динамика показателей основных субпопуляций лимфоцитов имеет разнонаправленный характер. Также определено, что влияние факторов высокогорья в совокупности с воздействием травмы на организм животных воздействуют непосредственно на клеточный компонент иммунного статуса, тем самым определяя при этом либо активацию, либо ингибирование тех или иных форм лимфоцитов. В дальнейшем это соответственно проявляется свою очередь или активацией, или угнетением компонентов иммунной системы при комплексном воздействии факторов высокогорья на фоне перенесенного перелома трубчатых костей. Также выявленные на этапах экспериментального исследования различия в концентрациях основных субпопуляций лимфоцитов доказывают дифференцированное участие в процессах регенерации костной ткани в условиях высокогорья на фоне экспериментально смоделированного перелома трубчатых костей животных.

Ключевые слова: иммунитет, лимфоциты, травма, перелом, повреждение, коррекция.

THE STATUS OF CELL IMMUNITY FOR TRAUMAS AMONG UNADAPTED TO THE HIGH MOUNTAIN REGIONS ANIMALS

Dzhumabekov S.A., Isakov B.D., Nuridin U.B., Sheraliev A.A.

Bishkek Scientific Research Center of Traumatology and Orthopedics of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Bishkek, e-mail. bnicto@dz.gov.kg

The goal of this research is the study of cell immunity features for traumas in high mountain regions at different period of stay in adapted and unadapted to the high mountain regions animals. We studied one hundred and forty white laboratory rats of both gender at a height of 3200 meters above sea level in high mountain regions of Too-Ashuu base. By the end of the experiment, the concentration of main lymphocyte subpopulations in the studied animals of the control group returned to the initial values, while in the animals of the main group these data remain significantly increased. It was found that in unadapted to the high mountain region animals the dynamics of main lymphocyte subpopulations for traumas had multidirectional character. It was also determined that the complex effect of high mountain factors and traumas have an impact on the cell-mediated response, causing an increase or decrease the concentration of one or another lymphocyte subpopulations. In turn, this indicated the multidirectional suppressive or stimulating effect of abovementioned factors on the immune system. Differences, found out under study in the composition of main lymphocyte subpopulations indicate the irregular its involvement in the osteogenesis regeneration in the high mountain regions on the different stages of experiment on the ground of modeled bone fractures.

Keywords: immunity, lymphocytes, trauma, fracture, injury, correcting.

На современном этапе клиники травматолого-ортопедического профиля исследуют состояния иммунной системы, и это является неотъемлемой составной частью

предоперационного обследования, послеоперационного ведения пациентов и даже периода реабилитации. Несмотря на то что состояние иммунной системы играет весомую роль при реакции организма на травматическое повреждение, многими травматологами и ортопедами уделяется недостаточно внимания этим показателям. Исследованию изменений показателей клеточного и гуморального иммунитета посвящено огромное количество публикаций, и эти моменты довольно широко освещены в современной литературе. Однако эти данные фрагментарны, не систематизированы и не имеют подробного анализа, что делает эту проблему весьма актуальной. Также четко определено, что воздействие на организм травмирующего агента определяет не только формирование механического повреждения, но и включает каскад реактивных изменений, в том числе и со стороны иммунной системы [1].

На современном этапе активность хирургов-травматологов обусловлена тем, что профильные клиники оснащены современными высокотехнологичными аппаратами и инструментами, которые позволяют травматологам и ортопедам проводить сложные и объёмные оперативные вмешательства на костях и суставах. Однако при этом наблюдается неоднозначное влияние операций на костно-мышечной системе на гомеостатические показатели организма животных на всех этапах лечения, начиная с момента операции и вплоть до окончания реабилитационных процедур. Также доказано, что деятельность компонентов иммунной системы опосредованно воздействует на репаративные возможности, не оставляя в стороне процессы регенерации костной ткани. Известно, что иммунная система оказывает непосредственное воздействие на интенсивность и характер процессов репарации тканей и органов, в том числе и костной [2].

Параллельно факторы высокогорья определяют особенности компенсаторно-регенеративных и приспособительных возможностей любой системы организма экспериментального животного. Это положение исходит из того, что все системы и органы и их функциональная активность находятся в тесном взаимоотношении с факторами окружающей среды, в которых существует данное животное [3].

Ответная реакция организма на комплексное воздействие факторов высокогорья и смоделированного закрытого перелома характеризуется активацией и высвобождением пептидов, цитокинов а также протеаз в больших концентрациях, которые участвуют в регуляторных механизмах [4].

Причем в разные сроки адаптации к условиям высокогорья и в зависимости от сроков консолидации костной ткани концентрация этих клеток и их фенотипическое различие претерпевают фазные изменения. Параллельно включается каскадная реакция последовательных изменений, обеспечивающих переход доминирующих функций от одних видов клеток к следующим. Одновременно каждый этап определяет интенсивность и выраженность последующих этапов. При этом запускается каскадный механизм, в

результате которого предыдущий этап обеспечивает подготовку и функционирование последующих этапов, параллельно обеспечивая выраженность и степень ее реализации [5]. Установлено, что активные цитокины вырабатываются эндотелиальным слоем сосудистой стенки во время их травматизации, а также продуцируются иммунными клетками, мобилизуемыми из общего кровеносного русла к месту повреждения (перелома) и окружающие его мягкие ткани вследствие повышения проницаемости сосудистой стенки [6]. При этом концентрация определенных в период кратковременной адаптации к условиям высокогорья иммунных клеток обуславливает характер дальнейшей иммунной реакции организма в ответ на комплексное воздействие травмы и факторов высокогорья [7].

Успехи, достигнутые в иммунологии в начале XX века, позволяют провести изучение состояния иммунной системы более досконально, и при этом немаловажная роль уделяется особенностям клеточного звена иммунитета. Так, по методике с применением монолокальных антител можно исследовать основные субпопуляции лимфоцитов. Любое повреждение сопровождается формированием различных иммунных реакций, которые объединены в иммунологические синдромокомплексы. Выделяют следующие виды синдромов: синдром аутоиммунного и аутоагрессивного ответов, синдром вторичного иммунодефицита, а также синдром асимметрии иммунного ответа [8]. Формирование иммунологических дисфункций является отличительным признаком течения приспособительных реакций при воздействии на организм травмирующего агента. Формирование дисбаланса между про- и противовоспалительными цитокинами в большей степени зависит от развития Т-клеточных дисфункций. На современном этапе данная проблема не потеряла свою активность в связи с тем, что при этом происходит формирование аутоиммунных реакций. Целью работы явилось исследование клеточного звена иммунитета у неадаптированных животных при комплексном воздействии на организм травмы и условий высокогорья.

Материал и методы исследования. Исследования в условиях эксперимента с целью определения изменений клеточных и гуморальных составляющих иммунной системы были проведены нами на 140 белых лабораторных крысах обоего пола. Всем животным был экспериментально смоделирован закрытый флекссионный перелом плюсневых костей стопы, и они были помещены в одинаковые ситуации как в условиях высокогорья, так и в низкогорье. Карантинный режим животных, их содержание, анестезиологические пособия и проведение операций осуществляли в соответствии с Приказом МЗ СССР от 1977 года за № 755. Все животные имели свободный доступ к питьевой воде, объем которой не ограничивался. Питание всех животных составлялось согласно Приказу МЗ СССР от 10.10.1983 года за № 1179 «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных

животных в учреждениях здравоохранения». Выполнению экспериментальных исследований предшествовал карантинный режим, на котором находились все животные на протяжении 25-30 дней. В течение этого времени животные находились под тщательным наблюдением, и после консультации с ветеринарами и исключения патологий, для дальнейшего экспериментального исследования основная группа была вывезена на перевал Тоо-Ашуу на высоту 3200 метров над уровнем моря.

Эксперименты проводились в двух сериях опытов на животных, которые не были адаптированы к условиям высокогорья. В первой серии (контрольная) на 18 животных экспериментальное исследование нами проводилось без закрытой флексионной остеотомии плюсневых костей. Исследования во второй (основной) серии на 39 крысах мы проводили на перевале Тоо-Ашуу, после проведения закрытой флексионной остеотомии плюсневых костей. Забор крови для исследования состояния иммунной системы в условиях низкогорья (контрольная группа) проводили на следующих трех этапах: сразу после экспериментального моделирования закрытой флексионной остеотомии, на 15-е сутки после перелома и на 30-е сутки после перелома. В первой группе высокогорной серии экспериментальное моделирование флексионного перелома и первый забор крови проводили после тридцатидневной адаптации к условиям высокогорья. Второй забор крови проводили через 15 дней – 45-е сутки эксперимента. Третий забор крови был проведен на 60-е сутки, т.е. через 30 суток после перелома. Во второй группе высокогорной серии экспериментальный перелом моделировали сразу после подъема животных на перевал Тоо-Ашуу. Далее забор крови осуществляли аналогично забору крови у животных низкогорной серии.

Методом непрямого иммунофлуоресцентного тестирования была определена фенотипическая характеристика основных субпопуляций лимфоцитов с помощью применения моноклональных антител фирмы «Сорбент» (Россия). В экспериментальном исследовании для определения концентрации Т-лимфоцитов применяли моноклональные антитела - CD-3; для определения концентрации Т-хелперов - CD-4; для определения концентрации Т-супрессоров-цитотоксических лимфоцитов - CD-8; для определения концентрации натуральных киллеров - CD-16; для определения концентрации В-лимфоцитов - CD-20. В соответствии с рекомендацией и инструкциями фирмы-производителя в объеме 0,1 мл выделенные из крови животных мононуклеары были отмечены моноклональными антителами. С помощью проточного цитофлуориметра Becton Dickinson учитывали реакции. Параллельно в процессе обработки полученных результатов данных определяли среднюю и ошибку средней. Применяя критерии Шапиро-Уилка в выборках, определяли нормальность распределения характеристик. С помощью критерия Вилкоксона, а также парных и непарных Т-критериев Стьюдента были определены статистические различия. В процессе сравнения

двух выборок нулевая гипотеза отвергалась при значении критерия $p \leq 0,05$. Также при проведении статистических обработок были использованы программные обеспечения Microsoft Office Excel, версия 2007, и программа AtteStat, версия 13.11.

Результаты исследования и их обсуждение. Анализируя результаты проведенных экспериментальных исследований, установили, что у животных, как адаптированных к условиям высокогорья, так и у неадаптированных к высокогорным условиям, после смоделированного перелома плюсневых костей определены существенные изменения в системе клеточного и гуморального звена иммунитета по сравнению с животными контрольной группы. Так, концентрация Т-хелперов (CD-4+) у животных контрольной группы на первые сутки (табл. 1) составляла $27,6 \pm 0,7\%$, в то время как у неадаптированных к условиям высокогорья животных в первые сутки после перелома отмечается достоверное снижение до $23,9 \pm 0,9\%$. Следует отметить, что в контрольной группе (животные, которым не моделировали перелом плюсневых костей) концентрация CD-4+ на последующих этапах эксперимента, т.е. на 15-е и 30-е сутки, остается сниженной и составляет соответственно $21,3 \pm 0,33\%$ и $21 \pm 0,3\%$. У неадаптированных животных основной группы на 15-е сутки эксперимента концентрация CD-4+ остается достоверно неизменной и только на 30-е сутки его концентрация возрастает до $28,8 \pm 0,9\%$. Данное снижение концентрации CD-4+ клеток на всем протяжении эксперимента у животных контрольной группы прежде всего связано с воздействием стрессовых факторов на организм, при которых повышается содержание глюкокортикоидов, вызывающих апоптоз лимфоидных тканей, а дальнейший возврат показателей CD-4+ у животных основной группы к исходным данным на 30-е сутки обусловлен воздействием катехоламинов, что способствует хоумингу лимфоцитов в тканях. Следует отметить, что CD4+ лимфоциты обладают хелперно-индукторной активностью, а CD8+ лимфоциты - супрессорно-цитотоксической активностью.

Таблица 1

Концентрация основных субпопуляций лимфоцитов в крови у неадаптированных к условиям высокогорья животных на разных этапах эксперимента (контрольная группа)

Сроки / Показатели	1-е сутки (n=6)	15-е сутки (n=6)	30-е сутки (n=6)
CD3	$32,5 \pm 0,4$	$36,8 \pm 0,51^*$	$31 \pm 0,5^*$
CD19	$23,6 \pm 0,33$	$24 \pm 0,25$	$22,75 \pm 1^*$
CD4	$27,6 \pm 0,7$	$21,3 \pm 0,33^*$	$21 \pm 0,3$
CD8	$13,3 \pm 0,6$	$15,5 \pm 0,2^*$	$16,5 \pm 0,9^*$
CD16	$12,8 \pm 1,2$	$16,2 \pm 0,6^*$	$14,5 \pm 0,4^*$

Примечание: * показатели статистически значимые ($p < 0,05$) отличаются от значений предыдущего срока.

Таблица 2

Концентрация основных субпопуляций лимфоцитов в крови у неадаптированных к условиям высокогорья животных на разных этапах эксперимента (основная группа)

Сроки Показатели	1-е сутки (n=14)	15-е сутки (n=13)	30-е сутки (n=12)
CD3	37,4±0,5	39,8±0,9*	42,7±0,5*
CD19	26,7±0,4	23,4±0,88*	28,6±0,63*
CD4	23,9±0,9	23,4±0,6	28,8±0,9*
CD8	15,4±0,46	17,3±0,45*	20±0,5*
CD16	15,7±0,2	17±0,7*	16,6±0,66*

Примечание: * показатели статистически значимые ($p < 0,05$) отличаются от значений предыдущего срока.

Концентрация общих Т-лимфоцитов (CD-3+) положительных клеток у животных основной группы на всем протяжении эксперимента остается достоверно повышенной по сравнению с животными контрольной группы (табл. 2). Так, на начало эксперимента показатели CD-3+ клеток составляли в контрольной группе $32,5 \pm 0,4\%$, в то время как в основной группе его значение равнялось $37,4 \pm 0,5\%$. Середина эксперимента характеризуется достоверным увеличением показателей как в контрольной, так и в основной группах. Однако к концу эксперимента у животных контрольной группы наблюдается постепенное возвращение к исходным данным ($31 \pm 0,5^*$), в то время как у животных основной группы концентрация CD-3+ клеток повышалась достоверно и была равна $42,6 \pm 0,4\%$. Выявленное повышение уровня в крови концентрации CD-3 клеток обусловлено тем, что стрессирующие факторы, травматическое повреждение как острый стресс-фактор в сочетании с факторами высокогорья активизируют иммунную систему. Это в свою очередь формирует селективную иммунную гипермобильность.

При исследовании концентрации CD-8 лимфоцитов отмечалось постепенное повышение показателей на всех этапах как в контрольной, так и в основной группе. Причем в основной группе показатели CD-8 лимфоцитов были достоверно выше уровня контрольной группы. Так, в контрольной группе на начало исследования показатель CD-8 составлял $13,3 \pm 0,6\%$, на 15-е сутки - $15,5 \pm 0,2^*\%$, а к концу исследования, т.е. на 30-е сутки, его концентрация достоверно повысилась до $16,5 \pm 0,9^*\%$. Что касается показателей CD-8 в основной группе, то после перелома его показатель равнялся $15,4 \pm 0,46\%$, на 15-е сутки его концентрация достоверно повысилась до $17,3 \pm 0,45\%$, а на 30-е сутки его значение равнялось $20 \pm 0,5^*\%$. Это означало, что к концу исследования показатель CD-8 клеток был на 24% больше исходных показателей и на 21% больше данных аналогичного периода контрольной группы. Установлено, что клетки, зараженные вирусом или адсорбирующие на своей

поверхности бактериальные клетки, однозначно служат прицельными мишенями для CD-8 клеток. Повышение содержания CD-8 в крови является доказательством стимуляции функциональных возможностей цитотоксических лимфоцитов к ингибированию провоспалительных факторов в местах повреждения.

Концентрация в крови В-лимфоцитов (CD19+) как в контрольной, так и в основной группе не имела однонаправленный характер и имела волнообразное течение. В основной группе отмечалось снижение показателей на 15-е сутки до $23,4 \pm 0,88\%$ (исходный уровень $26,7 \pm 0,4\%$) и резкое его повышение до $28,6 \pm 0,63\%$ к концу эксперимента. В контрольной группе также отмечалось волнообразное течение. Так, в начале эксперимента показатель равнялся $23,6 \pm 0,33\%$, к середине опытов отмечается повышение значений до $24 \pm 0,25\%$, и к концу исследования отмечается возврат показателей к исходным данным ($22,75 \pm 1\%$). Несмотря на волнообразное изменение показателей CD19+ клеток, в основной группе его показатели достоверно выше на всех этапах эксперимента по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы, что свидетельствует об активирующем воздействии на иммунную систему факторов высокогорья и травмы.

Концентрация в крови естественных киллерных клеток CD-16+ лимфоцитов у животных контрольной группы резко повысилась на 15-е сутки до $16,2 \pm 0,6\%$. К концу исследования отмечается незначительное снижение данных до $14,5 \pm 0,4\%$, однако этот показатель достоверно выше исходного на 2% ($12,8 \pm 1,2$). В основной группе значения показателей CD16+ клеток на этапах эксперимента отличались незначительно. После остеотомии значение этих клеток равнялось $15,7 \pm 0,2\%$ и повысилось на 15-е сутки до $17 \pm 0,7\%$, а на 30-е сутки отмечается незначительное снижение показателей до $16,6 \pm 0,66\%$. Если учесть, что CD16+ лимфоциты являются ответственными за естественную резистентность организма, то в условиях высокогорья на фоне травмы активация клеточного компонента иммунной системы имеет разнонаправленное течение.

В сравнительном аспекте полученные нами данные в некоторых моментах имеют довольно резкие противоречия, а в других случаях находят подтверждения. Так, Ежов Ю.И., изучая изменения в иммунной системе при различных видах патологий опорно-двигательного аппарата, определил напряженность функционирования гуморального компонента и депрессию клеточного звена иммунитета [9]. Другая группа исследователей во главе с Луневой С.И., исследуя изменения в иммунной системе, определили, что наблюдается депрессия пролиферативной активности лимфоцитов, с параллельным увеличением концентрации анти- и провоспалительных факторов [10]. Однако во всех случаях авторы определяют, что при повреждениях и патологиях опорно-двигательной системы в процесс вовлекаются все основные компоненты иммунитета. Это явилось

основанием для проведения мониторинга функционального состояния иммунной системы, от деятельности которой зависит течение заболевания, эффективность и результаты лечебных процедур [11].

Таким образом, комбинированное воздействие на организм высокогорных факторов и травматического повреждения непосредственно влияет на клеточный компонент иммунной системы. При этом определяется волнообразное изменение показателей с увеличением или снижением содержания тех или иных субпопуляций лимфоцитов. Изменения данных показателей доказывают разнонаправленное стимулирующее или ингибирующее влияние вышеуказанных факторов на компоненты иммунной системы. Установленные в процессе экспериментального исследования различия в содержании основных субпопуляций лимфоцитов доказывают неодинаковое их участие в процессах регенерации костной ткани в условиях высокогорья на разных этапах эксперимента. Так, практически все показатели основной группы достоверно выше, чем показатели контрольной группы. Причем на этапах эксперимента показатели (CD3+), (CD4+) и (CD8+) постепенно повышаются к концу исследования, а концентрации (CD16+) и (CD19+) имеют волнообразный характер.

Выводы

1. У неадаптированных к условиям высокогорья животных при травмах концентрация основных субпопуляций лимфоцитов имеет разнонаправленный характер. Это обусловлено тем, что как в контрольной, так и основной группах экспериментальных животных их показатели на всех этапах исследования не имеют определенной закономерности. Незначительное повышение на всех этапах эксперимента в обеих группах наблюдается в динамике показателей CD8. Такая тенденция к повышению определяется также в динамике CD3, однако эти изменения не наблюдаются у животных основной группы.

2. У животных контрольной группы к концу эксперимента показатели основных субпопуляций лимфоцитов возвращаются к исходным значениям, в то время как у животных основной группы к концу исследования эти данные остаются достоверно повышенными. Это свидетельствует о том, что в период кратковременной 30-дневной адаптации животных к условиям высокогорья у животных отмечается включение компенсаторно-приспособительных реакций. Это определяет нормализацию показателей основных субпопуляций лимфоцитов.

Список литературы

1. Мамытова Э.М. Особенности иммунного статуса в остром периоде черепно-мозговой травмы // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2013. № 4. С. 57-61.

2. Чепелева М.В., Карасев А.Г., Самусенко Д.В. Особенности иммунного статуса пациентов с замедленной консолидацией костной ткани после закрытой травмы длинных трубчатых костей // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014. № 5-2. С. 87-91.
3. Ерохин А.Н., Джумабеков С.А., Исаков Б.Д. Особенности системы гемостаза в условиях высокогорья при чрескостном дистракционном остеосинтезе методом Илизарова // Саратовский научно-медицинский журнал. 2012. Т. 8. № 2. С. 308-312.
4. Разнатовская О.М., Мирончук Ю.В. Динамика показателей цитокинового профиля у детей с впервые выявленным туберкулезом легких в ходе антимикобактериальной терапии // Запорожский медицинский журнал. 2018. № 2 (107). С. 206-210.
5. Иванюк Е.Э., Надеждин С.В., Покровская Л.А. Субпопуляции макрофагов и мезенхимные стволовые клетки в регуляции ремоделирования костной ткани // Цитология. 2018. № 4. Т. 60. С. 252-261.
6. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Журавлева Е.Ю., Яковлева Е.В. Механизмы повреждения ткани мозга на фоне острой фокальной ишемии // Журн. неврол. и псих. 1999. № 5. С. 55-61.
7. Федорова О.И., Подкорытова Е.В. Оценка стабильности и пластичности биоритмов физиологических процессов в комфортных и субэкстремальных среды (высокогорье и пустыня) // Физиология человека. 2009. № 5. Т. 35. С. 105-115.
8. Пичугина Л.В., Пинегин Б.В. Внутриклеточные цитокины: проблемы детекции и клиническое значение // Иммунология. 2008. № 1. С. 55-63.
9. Ежов Ю.И. Иммунный статус у детей младшего возраста с врожденной ортопедической патологией и его коррекция на этапе хирургической реабилитации // Сборник тезисов IX съезда травматологов-ортопедов России. 2010. Т. III. С. 893-894.
10. Лунева С.Н., Ткачук Е.А., Стогов М.В. Биохимические показатели в оценке репаративного остеогенеза у пациентов с различными типами скелетной травмы // Гений ортопедии. 2010. № 1. С. 112-115.
11. Дмитриева Л.А., Кувина В.Н., Кувин С.С. Изменения иммунного статуса у подростков на ранних стадиях коксартроза в условиях техногенного загрязнения среды обитания // Сборник тезисов докладов VIII съезда травматологов ортопедов-ортопедов России. 2006. Т. II. 893 с.