ОСОБЛИВОСТІ ПОРУШЕНЬ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ЛЕГКІЙ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВІЙ ТРАВМІ У ЩУРІВ

ЛІСЯНИЙ М.І., БЕЛЬСЬКА Л.М., ПАЛАМАРЬОВА А.В., ПОТАПОВА А.Г.

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» відділ нейроімунології

Черепно-мозкова травма відноситься до однієї із актуальних проблем сучасної медицини, що пов'язано із неухильним збільшенням кількості випадків нейротравми, великою латентністю та інвалідизацією потерпілих (1).

Важливе значення в патогенезі ЧМТ відіграє імунна система, яка є основним механізмом вторинного ушкодження клітин мозку, що проявляється різними порушеннями в усіх ланках імунітету, а саме змінами рівня Т-, В-, НК-клітин, синтезу цитокінів, розвитком аутоімунних реакцій до антигенів головного мозку [2,3].

Активація імунної системи при ЧМТ залежить від тяжкості ЧМТ. При тяжкій ЧМТ спостерігається пригнічення активності імунних клітин, лімфо- та моноцитопенія, зниження активності ефекторних ланок імунітету [4,5], в той час як при відносно нетяжкій ЧМТ, а саме струсу та забою легкого ступеня, відбувається активація певних ланок імунітету, що спонукає до використання імуносупресивної терапії після ЧМТ [1,2,6]. Імунні реакції при ЧМТ розпочинаються з активації резидентних клітин головного мозку, а саме мікроглії та астроглії, що супроводжується активацією, фагоцитозом пошкоджених фрагментів клітин мозку та синтезом прозапальних цитокінів та хелперів, котрі в свою чергу приваблюють до місць ушкоджених нейтрофілів, моноцитів, а потім і лімфоцитів, що призводить до розвитку системної імунної відповіді організму [4,6,7].

Не дивлячись на велику кількість досліджень патогенезу та імунології тяжкої ЧМТ, питання легкої ЧМТ залишається недостатньо дослідженим, особливо зміни проліферативної та цитотоксичної активності імунних клітин в різні терміни після ЧМТ [2,7].

Метою даної роботи було вивчення імунної активності клітин селезінки у щурів на фоні легкої ЧМТ.

Матеріали та методи

Моделювання експериментальної ЧМТ у щурів

В роботі використані експериментальні тварини (аутбредні статевозрілі щури, самки (38) розведення віварію ДУ «ІНХ НАМН»). Усі роботи з експериментальними тваринами проводили з дотриманням законодавчих норм та вимог Закону України №3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), з урахуванням принципів біоетики та норм біологічної безпеки. Тварин утримували у стандартних умовах акредитованого віварію, знеболення та евтаназію проводили під ефірним наркозом. Черепно-мозкова травма моделювалась шляхом падіння вантажу (вагою 50г) з висоти 120см на голову щурів, що були занаркотизовані внутрішньочеревно 0,5мл 5,0% розчином тіопенталу і знаходились в стані наркотичного сну, який тримався до 30 хв. Голову тварин розташовували під пластиковою вертикальною трубою діаметром 2,5 см, висотою 120 см таким чином, щоб удар (контакт) падаючого вантажу приходився на ліву півкулю в області тім'яної та потиличної долі головного мозку [4]. У піддослідних тварин, які отримали ЧМТ, а також в групі порівняння (контрольній) досліджували показники імунітету у селезінці.

нитілк хиннумі ітсонвитка йонвитарефілорп яннечанзиВ.

Здатність до проліферації під дією міогенів чи антигенів є однією із основних характеристик імунних клітин, яка досить широко використовується в імунології протягом 20-го та 21-го століття. За цей час відпрацьовано багато різних модифікацій, які відомі під загальною назвою реакції бластної трансформації лімфоцитів (РБТЛ). Для проведення цієї реакції використовуються різні стандартні

міогени. Найбільше поширення отримали такі міогени як фітогемаглютинін (ФГА), конконавалін (КонаА); в нашій роботі використана мікромодифікація постановки РБТЛ з МТТ реєстрацією. Реакцію РБТЛ проводили в 1,0мл середовища 199 з 10% ембріональною сироваткою та гентаміцином (200 од./мл), куди вносили по 100,0мл суспензії спленоцитів (5×10^6 /мл) або виділених на градієнті лімфоцитарних та нейтрофільних фракцій. В якості мітогенів використовували ФГА (USA) в дозі 10,0 мкл/мл або КонаА в дозі 40,0 мкг/мл. [4]. Реакцію проводили протягом 48 годин, а потім визначали рівень МТТ активності з реєстрацією на імуноферментному аналізаторі при довжині хвилі 480 нм. Визначався індекс стимуляції проліферації клітин як відношення екстинції проби з мітогеном до екстинції проби без мітогена (контрольної).

Цитофлуориметричне визначення гіподиплоїдних клітин

Суспензію клітин селезінки в дозі 1×10^6 клітин в мл в об'ємі 200,0 мкл центрифугували при 1000 об/хв. 5 хвилин, видаляли надосад. До осаду клітин добавляли 400 мкл 70% етилового спирту, охолодженого в морозильній камері і інкубували в холодильнику 1 годину при t 4-6° С. Спирт додавали по краплям, перемішували з метою уникнення агрегатів. Після інкубації центрифугували, спирт відбирали і відмивали 1 раз забуференим фізрозчином (ЗФР). До осаду клітин добавляли розчин пропідіума йодиду в концентрації 5 мкл/мл в 200,0 мкл ЗФР, який містив 0,1% тритону X-100 та 0,1% цитрату натрію. Клітини перемішували з пропідіумом йодидом і інкубували 1 годину при t 4°С [8]. Потім клітини перемішували і переносили в пробірки для проточної цитофлуориметрії і за допомогою прямого чи бокового розсіювання визначали відсоток гіподиплоїдних клітин в діапазоні 100-102 та диплоїдних клітин в регіоні 103 та більше. Клітини, що були виявлені в регіоні 100-102 відносили до гіподиплоїдних, тому що містять мало ДНК та знаходяться в фазі активації або апоптозу [8].

Визначення цитотоксичної активності імунних клітин

Цитотоксична активність клітин селезінки визначалась спектрофотометричним методом по модифікованій методиці, описаній [8] по відношенню до еритроцитів людей. Співвідношення клітин-ефекторів до клітин-мішеней складало 2:1, а термін інкубації складав 3 години. В супернатантах клітинних культур визначали спектрометрично рівень гемоглобіну при 410 нм. і розраховували по стандартній методиці [9] цитотоксичну активність імунних клітин.

Статистичну обробку матеріалів проводили по комп'ютерній програмі Statistika 8 з визначенням середньої арифметичної та квадратичного відхилення (σ), показника «Р» та за програмою статобробки для Microsoft excel 2007 з визначенням середнього арифметичного і стандартного статистичного відхилення ($m \pm \sigma$) і показника t-Ст'юдента.

Результати

Дослідження проліферативної активності клітин селезінки у щурів після ЧМТ виявило підвищення показників у ранні терміни через 24 години після нейротравми по даним проліферації клітин на два різних мітогени (ФГА та КонаА). Особливо висока активація проліферації була на КонаА, яка збільшувалась практично в 2 рази. На 5-у добу після травми активація спленоцитів в тесті проліферації дещо зменшувалась в порівнянні з показниками, які були на 1-у добу після ЧМТ.

При визначенні цитотоксичної активності спленоцитів по відношенню до еритроцитів було встановлено, що через 24 години після ЧМТ вірогідно пригнічується кілерна активність практично на 60%, але в подальшому має місце відновлення цих показників. Отримані дані проліферативної та цитотоксичної активності спленоцитів вказують, що уже зразу після ЧМТ, яка є локальним ушкодженням паренхіми мозку за межами гематоенцефалічного бар'єру, відбуваються зміни в системному імунитеті.

Подібні результати були отримані [9], де показана активація проліферативної активності спленоцитів після ЧМТ, яка супроводжується стимуляцією гіпоталамо-гіпофізарної системи організму уже з перших годин після ЧМТ, все це вказує на те, що в патогенезі ЧМТ важливе місце відіграють не лише локальні патологічні процеси у пошкодженій зоні головного мозку, а й гормональна, цитокиново-запальна перебудова нейрорегуляторних систем організму. Внаслідок нейроімунної регуляції організму відбуваються різноспрямовані реакції імунної системи, з одного боку, ідуть процеси активації проліферації на мітогени, з іншого відмічається гальмування цитотоксично-кілерної активності імунних

клітин.

Найбільш значні зміни в активації імунних клітин виявлено на 1-у добу після травми, які уже на 5-у добу значно зменшуються, що свідчить про тимчасове порушення імунної системи. Вивчення змін в складі гіпо- та гіпердиплоїдних клітин селезінки методом проточної цитофлуориметрії виявило, що через 24 години після ЧМТ збільшується в 1,5 рази кількість гіподиплоїдних клітин селезінки на фоні суттєвого зменшення гіпердиплоїдних клітин, які містять повний набір хромосом та знаходяться в проліферуючому стані. Паралельно з цим встановлено підвищення рівня клітин, які знаходяться в стані активації в різних фазах мітозу. В подальшому до 5-ї доби після травми відбувається відновлення показників вмісту гіпо- та гіпердиплоїдних клітин селезінки за винятком популяції клітин, які ще знаходяться в фазі завершення клітинного циклу.

Дослідження рівня гіподиплоїдних клітин виявило, по-перше, динамічну зміну їх в залежності термінів травми, по-друге встановлено, що рівень їх залежить від зменшення кількості гіпердиплоїдних клітин, які можливо вступили в цикл проліферації та поділу під дією факторів запального та гормонального характеру, про що вказувалось вище. Ця активація відбувається спонтанно в організмі і корелює з проліферативною активністю в тесті проліферації з мітогеном.

Активация спленоцитів носить короточасний характер і уже на 5-у добу гальмується, що свідчить про стихання імунних процесів в селезінці і можливе їх переміщення в зону ушкодження головного мозку після ЧМТ.

Узагальнюючи отримані результати, можна сказати, що ЧМТ викликає суттєву перебудову функціонування імунної системи, яка виникає в ранні терміни після ЧМТ і уже на 5-у добу поступово відновлюється. Зміни в імунній системі після ЧМТ досить детально вивчені при тяжкій ЧМТ, де розвивається дисбаланс в рівні субпопуляцій імунних клітин, що призводить до посттравматичного імунодефіциту [3,5,7]. При легкій експериментальній ЧМТ порушення в імунній системі проявляються в основному лише в ранні строки і характеризуються різноспрямованими змінами, які уже з 5-ї доби починають відновлюватись, що вказує на необхідність проведення відповідної імунокорегуючої терапії починаючи з ранніх термінів.

Рис 1. Показники проліферації спленоцитів щурів в тесті бласттрансформації клітин з мітогенами через 24 години та 5 діб після ЧМТ

Таблиця 1

Цитотоксична активність спленоцитів щурів через 24 години та на 5-у добу після ЧМТ (у.о.)

		24 години	5 доба
p		<0,05	>0,05

Таблиця 2

Кількість гіпо-, гіпердиплоїдних клітин селезінки щурів через 24 години та на 5 добу після ЧМТ (%)

гіподиплоїдні	нормодиплоїдні	гіпердиплоїдні
---------------	----------------	----------------

24 години	23,8±48,0 <0,01	45,2±12,3 <0,05	2,5±13,39 <0,05

Висновки

При експериментальній ЧМТ у щурів відбуваються різноспрямовані зміни в активності спленоцитів, які проявляються підвищенням проліферативної здатності в тесті РБТЛ з ФГА та КонА міогенами та зниженням цитотоксичної активності спленоцитів.

Визначення рівня гіподиплоїдних клітин в складі клітин селезінки виявило максимальне їх підвищення через 24 години після травми на фоні зменшення кількості гіпердиплоїдних клітин, про що свідчить перехід клітин у стадію активації та розмноження.

Зміни проліферативної та цитотоксичної активності спленоцитів виявляються уже через 24 години після ЧМТ і поступово зменшуються на 5 добу після травми.

РЕЗЮМЕ

ОСОБЛИВОСТІ ПОРУШЕНЬ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ЛЕГКІЙ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВІЙ ТРАВМІ У ЩУРІВ

*Лісяний М.І., Бельська Л.М., Паламарьова А.В.,
Потапова А.Г.*

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» Відділ нейроімунології

Вступ. Черепно-мозкова травма (ЧМТ) є одним із поширених захворювань людини, яка супроводжується великою летальністю та інвалідизацією потерпілих. В патогенезі ЧМТ виділяється, як мінімум, 2 періоди, які зв'язані як із первинним ушкодженням нервових клітин травмуючим чинником, так і вторинними запально-деструктивними змінами, котрі розвиваються протягом тривалого часу після травми. Важливу роль в розвитку другого періоду ЧМТ відіграє імунна система організму, яка може ускладнювати перебіг ЧМТ та по різному діяти в залежності від тяжкості травми.

Мета роботи. В роботі був досліджений стан проліферативної та цитотоксичної здатності спленоцитів при легкій ЧМТ у щурів, яке викликалось падінням вантажу вагою 50г з висоти 120см на голову тварини.

Матеріали та результати. Проведеними дослідженнями встановлено, що уже через 24 години після травми спостерігається збільшення проліферативної активності спленоцитів в тесті проліферації з міогенами, особливо з КонА міогеном. В той час як цитотоксична активність спленоцитів суттєво гальмується в цей час та зменшується кількість гіпердиплоїдних клітин в складі селезінки. В більш пізні терміни після травми, на 5 добу, відбувається значне відновлення імунологічних показників, що свідчить про те, що імунна система уже з перших годин після легкої ЧМТ різноспрямовано змінюється, переважно в сторону активації проліферації, що може ускладнювати перебіг травматичного періоду.

Висновки. При експериментальній легкій ЧМТ у щурів відбуваються різноспрямовані зміни в активності імунних клітин, які свідчать про активацію імунної системи в ранні терміни після травми

Ключові слова: черепно-мозкова травма у щурів, спленоцити, проліферація, цитотоксична активність, гіподиплоїдні клітини.

SUMMARY

FEATURES OF IMMUNE SYSTEM DISORDERS IN EXPERIMENTAL BRAIN TRAUMA IN RATS

Lisaniy M., Belska L., Palamaryova A., Potapova A.

State Institution «Institute of Neurosurgery named after. Acad. A.P. Romodanov of NAMS of Ukraine» Department of neuroimmunology

Introduction. Traumatic brain injury (TBI) is one of the common diseases of the person, which is accompanied by high mortality and disability of the victims. In the pathogenesis of TBI there are at least 2 periods that are associated with both primary nerve cell injury by the traumatic factor and secondary inflammatory-destructive changes that develop over a long period after the injury. An important role in the development of the second period of TBI is played by the body's immune system, which can complicate the course of TBI and act differently depending on the severity of the injury.

The goal of the work. The work investigated the state of proliferative and cytotoxic ability of splenocytes in light TBI in rats, which was caused by a drop in weight of 50 g from a height of 120 cm per animal.

Materials and results. Studies have shown that within 24 hours after injury, there is an increase in the proliferative activity of splenocytes in the test for proliferation with mitogens, especially with KonA mitogen. While the cytotoxic activity of splenocytes is significantly inhibited at this time and the number of hyperdiploid cells in the spleen is reduced. At a later date after the injury, for 5 days, there is a significant recovery of immunological parameters, indicating that from the first hours after a mild TBI, the immune system changes in different directions, mainly towards the activation of proliferation, which may complicate the course the traumatic period.

Conclusions. In experimental mild TBI, rats have differentiated changes in the activity of immune cells, which indicate the activation of the immune system in the early stages after injury.

Key words: traumatic brain injury in rats, splenocytes, proliferation, cytotoxic activity, hypodiploid cells.

РЕЗЮМЕ

ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЛЕГКОЙ ЧЕРЕПНОМОЗГОВОЙ ТРАВМЕ У КРЫС

*Лисяный М.И., Бельская Л.Н., Паламарьова А.В.,
Потапова А.Г.*

ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины» Отдел нейроиммунологии

Введение. Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одним из распространенных заболеваний человека, сопровождается большой летальностью и инвалидизацией пострадавших. В патогенезе ЧМТ выделяется, как минимум, 2 периода, которые связаны как с первичным повреждением нервных клеток травмирующим фактором, так и вторичными воспалительно-деструктивными изменениями, которые развиваются в течение длительного времени после травмы. Важную роль в развитии второго периода ЧМТ играет иммунная система организма, которая может осложнять течение ЧМТ и по-разному действовать в зависимости от тяжести травмы.

Цель работы. В работе было исследовано состояние пролиферативной и цитотоксической способности спленоцитов при легкой ЧМТ у крыс, которое вызывалось падением груза весом 50 г с высоты 120 см на голову животного.

Материалы и результаты. Проведенными исследованиями установлено, что уже через 24 часа после травмы наблюдается увеличение пролиферативной активности спленоцитов в тесте пролиферации с миогенами, особенно с КонА миогеном. В то время как цитотоксическая активность спленоцитов существенно тормозится в это время и уменьшается количество гипердиплоидных клеток в составе селезенки. В более поздние сроки после травмы, на 5 сутки, происходит значительное восстановление иммунологических показателей, что свидетельствует о том, что иммунная система уже с первых часов после легкой ЧМТ разнонаправленно меняется, преимущественно в сторону активации пролиферации, что может осложнять течение травматического периода.

Выводы. При экспериментальной легкой ЧМТ у крыс происходят разнонаправленные изменения в активности иммунных клеток, которые свидетельствуют об активации иммунной системы в ранние сроки после травмы

Ключевые слова: черепно-мозговая травма у крыс, спленоциты, пролиферация, цитотоксическая активность, гиподиплоидные клетки.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Коновалов А.Н., Лихтерман Л.Б., Потапов А.А. Клиническое руководство по черепно-мозговой травме.- Антидор.- 1998, Москва.-Т.1.-553с.
- Исаева Е.Х., Антонюк И.А., Придякина А.В., Евстафьева А.Е. Иммунологические изменения при черепно-мозговой травме //Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.-2014,№8-2.-С.41-47.
- Рыбакина Е.Г., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Филатенкова Т.А., Дмитриенко Е.В. Клеточно-молекулярные механизмы изменения защитных функций организма при черепно-мозговой травме и попытка лечения //Медицинский академический журнал,2014. Т.14,№4.-С.55-62.
- Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Филатенкова Т.А., Серебряная Н.Б. Коррекция нарушений нейроиммунных взаимодействий при экспериментальной черепно-мозговой травме препаратом рекомбинантного интерлейкина-2 //медицинская иммунология,2018.-Т.20,№2.-С.177-178.
- Мамытова Э.М. Динамика иммунологического ответа у пациентов с черепно-мозговой травмой в раннем посттравматическом периоде //Медицинская наука и образование Урала.-2014.-Т.15,№3.-С.96-99.
- Леонов А.В., Иванов Н.К. Апоптоз при тяжелой черепно-мозговой травме и его изменения при иммуномодуляции ронколейкином //Иммунология.-2006.-Т.27,№4.-С.246-248.
- Лисяный Н.И. Двойная роль иммунной системы в патогенезе черепно-мозговой травмы //Український нейрохірургічний журнал.-2019,№1.-С.3-9.

Пинегин Б.В. Ярилин. А.А. Симонова А.В. и др. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека . (Пособие для врачей) Москва 2001- 55 с.

Мельников О.Ф., Заяц Т.А. Сравнение радиоизотопного и электрофотометрического методов определения цитотоксических клеток //Лабораторная диагностика.-1999,№1.-С.43-44

.йінтусдів вісеретні ткілфнок

акьсротаA акдівод

Лісяний Микола Іванович

Начальник відділу нейроімунології
ДУ «Інститут нейрохірургії НАМНУ», член-корр. НАМНУ, професор.
Адреса: вулиця Платона Майбороди, 32, Київ, 04050
моб. телефон: +38 067-595-34-36
E-mail: nimun.neuro@gmail.com

Лисяний Николай Иванович

Начальник отдела нейроиммунологии
ГУ «Институт нейрохирургии НАМНУ», член-корр. НАМНУ, профессор.
Адрес: улица Платона Майбороды, 32, Киев, 04050
моб. телефон: +38 067-595-34-36
E-mail: nimun.neuro@gmail.com

Lysianiy Mykola

Head of Neuroimmunology Department, State
Institution «Institute of Neurosurgery NAMSU»,
Corr-Member NAMNU, Professor.
Address: 32, Plato Mayboroda Street,
Kyiv, 04050
Mob. tel.: +38 067-595-34-36
E-mail: nimun.neuro@gmail.com

Бельська Людмила

Миколаївна

Старший науковий співробітник відділу нейроімунології ДУ «Інститут нейрохірургії НАМНУ», кандидат біологічних наук.
Адреса: вулиця Платона Майбороди, 32, Київ, 04050
Моб. тел.: +38 050-590-88-61
E-mail: nimun.neuro@gmail.com

Бельская Людмила

Николаевна

Старший научный сотрудник отдела нейро-иммунологии ГУ «Институт нейрохирургии НАМНУ», кандидат биологических наук.
Адрес: улица Платона Майбороды, 32, Киев, 04050
Моб. Тел.: +38 050-590-88-61
E-mail: nimun.neuro@gmail.com

Belska Lyudmyla

Senior Researcher, Department of Neuroimmunology, Institute of Neurosurgery NAMSU. Candidate of Biological Sciences.
Address: 32, Plato Mayboroda Street, Kyiv, 04050
Mob. tel.: +38 050-590-88-61
E-mail: nimun.neuro@gmail.com

Паламарьова Настя

Володимирівна

Молодший науковий співробітник відділу нейроімунології ДУ «Інститут нейрохірургії НАМНУ».

Адреса: вулиця Платона Майбороди, 32, Київ, 04050
моб. тел.: +38 063-842-53-86
E-mail: nimun.neuro@gmail.com

Паламарьова Настя

Владимировна

Младший научный сотрудник отдела нейро-иммунологии ГУ «Институт нейрохирургии НАМНУ».
Адрес: улица Платона Майбороды, 32, Киев, 04050
моб. тел.: +38 063-842-53-86
E-mail: nimun.neuro@gmail.com

Palamaryova Nastya

Junior Research Fellow, Department of Neuroimmunology, Institute of Neurosurgery, NAMSU.
Address: 32, Plato Mayboroda Street, Kyiv, 04050
mob. tel.: +38 063-842-53-86
E-mail: nimun.neuro@gmail.com

Потапова Антоніна Гнатівна

Молодший науковий співробітник відділу нейроімунології ДУ «Інститут нейрохірургії НАМНУ».
Адреса: вулиця Платона Майбороди, 32, Київ, 04050
моб. тел.: +38 098-0848-54-33
E-mail: nimun.neuro@gmail.com

Потапова Антонина Игнатьевна

Младший научный сотрудник отдела нейро-иммунологии ГУ «Институт нейрохирургии НАМНУ».
Адрес: улица Платона Майбороды, 32, Киев, 04050
моб. тел.: +38 098-0848-54-33
E-mail: nimun.neuro@gmail.com

Potapova Antonina

Junior Research Fellow, Department of Neuroimmunology, Institute of Neurosurgery, NAMSU.
Address: 32, Plato Mayboroda Street, Kyiv, 04050
mob. tel.: +38 098-0848-54-33
E-mail: nimun.neuro@gmail.com

Стаття надійшла до редакції 14.02.2020 р.