

STATE OF THE IMMUNE STATUS OF CHILDREN LIVING IN CONDITIONS OF AEROGENIC EXPOSURE TO METALS

Otavina E.A., Bubnova O.A.

*FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk
Management Technologies", Perm, Russia*

It has been demonstrated that among the child population, living under exposure to aluminium, more than 40% of children have a significant ($p < 0.05$) decrease relative to the norm of phagocytic activity, as well as a significant change ($p < 0.05$) in the CD- immunogram- oppression Annexin V-FITC+7AAD negative cells, CD95⁺, Bax, Bcl-2 protein (from 57 to 73% of children) and 56% of children have an activation of CD127. The IgG testing detected a specific sensitization of a body in relation of the reference value and the control group index by 1.5 time.

Key words: Annexin V-FITC + 7AAD, CD95⁺, Bax, Bcl-2, aluminium

ПОКАЗАТЕЛИ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ С ЭРИТРОПОЭТИНОМ

Осиков М. В., Симонян Е. В., Седгалина О. Т.,
Никушкина К. В., Мезенцева Е. А.

*ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Челябинск, Россия*

Цель работы – исследовать влияние трансдермальной пленки (ТДП) с эритропоэтином (ЭПО) на показатели врожденного и адаптивного иммунитета при экспериментальной термической травме (ТТ). Эксперимент выполнен на 70 белых нелинейных половозрелых крысах, которые были разделены на 3 группы: 1 (n=10) – интактный контроль, 2 (n=30) – ТТ, 3 (n=30) – ТТ с наложением ТДП с ЭПО. ТТ III степени площадью 3,5% моделировали погружением участка межлопаточной области животного в очищенную воду с температурой 98-99°C на 12 с. Исследования проводили на 3, 8 и 14 сутки ТТ. Количество нейтрофилов в крови определяли на гематологическом анализатора «Medonic – М 16» (Швеция). Поглотительную способность нейтрофилов крови исследовали с использованием частиц латекса, кислородзависимый метаболизм – в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте. С помощью проточного цитофлуориметра «Navios» в крови определяли количество CD3⁺ и CD45RA⁺ лимфоцитов. Гибель лимфоцитов оценивали по окрашиванию клеток конъюгированным с флуорохромоманнексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD). Установлено, что при экспериментальной ТТ в крови увеличивается количество нейтрофилов, их поглотительная и НСТ-редуцирующая способность, снижается количество CD3⁺ и CD45RA⁺ лимфоцитов на 5, 8 и 14 сутки, увеличивается в крови количество лимфоцитов с признаками апоптоза и/или некроза на 3 и 8 сутки. Применение ЭПО в составе ТДП при ТТ не сопровождается изменением количества нейтрофилов в крови на 3, 8 и 14 сутки, приводит к снижению активности фагоцитоза на 14 сутки, интенсивности фагоцитоза – на 8 сутки, активности и интенсивности спонтанного НСТ-теста – на 14 сутки, индуцированного НСТ-теста – на 3, 8 и 14 сутки; увеличению CD3⁺ лимфоцитов в крови на 8 сутки, снижению количества в крови лимфоцитов с признаками апоптоза и/или некроза на 14 сутки.

Ключевые слова: термическая травма, трансдермальная пленка, эритропоэтин, иммунитет

Термическая травма (ТТ) является одной из самых распространенных травматических повреждений. Площадь и глубина повреждения определяют развитие местных и системных осложнений, патогенез которых связан, в том числе, с изменениями клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Актуальным при лечении ТТ является использование раневых покрытий с эндогенными веществами, обладающими иммуностимулирующим действием, в частности, эритропоэтина (ЭПО). Ранее нами было продемонстрировано влияние ЭПО на иммунный статус при различной патологии [1, 2].

Цель работы: исследовать влияние трансдермальной пленки с ЭПО на показатели врожденного и адаптивного иммунитета при экспериментальной термической травме.

Методы исследования. Эксперимент выполнен на 70 белых нелинейных крысах массой 240 ± 20 г. при строгом соблюдении рекомендаций Европейской Комиссии 2007/526/ЕС от 18.06.2007. Животные разделены на 3 группы: 1 (n=10) – интактный контроль, 2 (n=30) – ТТ с наложением асептической повязки (ТТ), 3 (n=30) – ТТ с наложением трансдермальной пленки (ТДП) с ЭПО [3] и асептической повязки (ТТ+ЭПО). ТТША степени площадью 3,5% моделировали погружением участка межлопаточной области животного (анестезия «Золетиллом», «VirbacSanteAnimale», Франция), в очищенную воду с температурой 98-99°C на 12 с. Исследования проводили на 3, 8 и 14 сутки ТТ. Количество нейтрофилов в крови определяли на гематологическом анализаторе «Medonic – M16» (Швеция). Поглотительную способность нейтрофилов крови исследовали с использованием частиц латекса, кислородзависимый метаболизм – в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте. С помощью проточного цитофлуориметра «Navios» («BeckmanCoulter», США) в крови определяли количество CD3⁺ и CD45RA⁺ лимфоцитов с использованием крысиных моноклональных антител («eBioscience» (США)). Гибель лимфоцитов оценивали по окрашиванию клеток конъюгированным с флюорохромом аннексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) («BeckmanCoulter», США). Результаты обрабатывали с использованием программы «Statistica 10.0 for Windows». Характеристика выборки представлена в формате Me (Q₂₅-Q₇₅).

Результаты исследования. Установлено, что при ТТ общее количество нейтрофилов

в крови статистически значимо увеличивается на 8 и 14 сутки ($3,61 (3,28-3,87) \times 10^9/\text{л}$ и $3,05 (2,08-3,29) \times 10^9/\text{л}$ соответственно; в контрольной группе $1,40 (1,20-2,37) \times 10^9/\text{л}$; $p < 0,05$). Поглотительная способность нейтрофилов увеличивается на 3, 8 и 14 сутки ТТ по показателям активности фагоцитоза (соответственно $60,00 (52,00-64,00)\%$; $64,00 (54,00-64,00)\%$ и $68,00 (68,0-72,0)\%$; в контрольной группе $39,00 (36,00-43,00)\%$; $p < 0,05$), интенсивности фагоцитоза (соответственно $2,12 (1,96-2,46)$ у.е.; $2,51 (1,70-2,51)$ у.е. и $2,74 (1,18-2,78)$ у.е.; в группе контроля $0,88 (0,78-0,92)$ у.е.; $p < 0,05$). При оценке НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов при ТТ установлено, что на 3, 8 и 14 сутки увеличивается активность ($6,00 (4,00-10,00)\%$; $16,00 (14,00-20,00)\%$ и $10,0 (10,0-30,0)\%$ соответственно; в контрольной группе $3,50 (2,00-4,00)\%$; $p < 0,05$) и интенсивность спонтанного НСТ-теста ($0,08 (0,06-0,12)$ у.е.; $0,20 (0,18-0,28)$ у.е. и $0,12 (0,11-0,38)$ у.е. соответственно; в контрольной группе $0,04 (0,02-0,05)$ у.е.; $p < 0,05$). В индуцированном НСТ-тесте на 3, 8 и 14 сутки увеличиваются показатели активности (соответственно $19,00 (16,00-21,00)\%$; $20,00 (18,00-20,00)\%$ и $20,0 (16,0-22,0)\%$; в контрольной группе $5,00 (3,00-6,00)\%$, $p < 0,05$) и интенсивности (соответственно $0,26 (0,21-0,26)$ у.е.; $0,22 (0,17-0,24)$ у.е. и $0,22 (0,18-0,24)$ у.е.; в контрольной группе $0,06 (0,04-0,06)$ у.е., $p < 0,05$). Установлено, что на 8 и 14 сутки ТТ статистически значимо снижается количество CD3⁺ (соответственно $1,20 (0,90-1,30) \times 10^9/\text{л}$ и $2,50 (2,40-2,60) \times 10^9/\text{л}$; в группе контроля $3,00 (2,80-3,40) \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$) и CD45RA⁺ (соответственно $0,80 (0,80-1,10) \times 10^9/\text{л}$ и $0,60 (0,50-2,10) \times 10^9/\text{л}$; в группе контроля $2,10 (2,00-2,20) \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$) лимфоцитов. Ведущим механизмом снижения количества лимфоцитов в крови при ТТ выступает усиление их гибели путем апоптоза и/или некроза. На 3 и 8 сутки ТТ увеличивается количество лимфоцитов в крови с ранними признаками апоптоза (соответственно $11,90 (7,30-17,65)\%$ и $21,40 (19,00-26,90)\%$, в группе контроля $7,85 (7,25-8,35)\%$; $p < 0,05$) и поздними признаками апоптоза, признаками некроза ($0,95 (0,55-1,40)\%$ и $4,65 (2,50-7,40)\%$ соответственно, в группе контроля $0,10 (0,10-0,30)\%$; $p < 0,05$), а на 14 сутки данные показатели статистически значимо не изменяются. Количество интактных лимфоцитов снижается на 8 сутки ТТ (соответственно $75,15 (69,15-79,65)\%$,

в группе контроля 91,90 (81,80-93,10)%; $p < 0,05$) и статистически значимо не изменяется на 3 и 14 сутки эксперимента.

Применение ТДП с ЭПО при ТТ не приводит к изменению количества нейтрофилов в крови на 3, 8 и 14 сутки. Активность фагоцитоза нейтрофилов статистически значимо не изменяется на 3 и 8 сутки ТТ, снижается на 14 сутки (42,00 (40,00-46,00)%; $p < 0,05$). Интенсивность фагоцитоза статистически значимо не изменяется на 3 и 14 сутки ТТ и снижается на 8 сутки (1,74 (1,32-1,86) у.е.; $p < 0,05$). В спонтанном НСТ-тесте показатели активности и интенсивности статистически значимо не изменяются на 3 и 8 сутки и снижаются на 14 сутки (соответственно 4,50 (2,00-10,00)% и 0,05 (0,02-0,10) у.е.; $p < 0,05$). В индуцированном НСТ-тесте на 3, 8 и 14 сутки ТТ в условиях применения ТДП с ЭПО снижаются показатели активности (соответственно 10,00 (4,00-10,00)%; 14,00 (8,00-16,00)% и 13,50 (12,00-20,00)%, $p < 0,05$) и интенсивности (соответственно 0,13 (0,04-0,14) у.е.; 0,16 (0,10-0,16) у.е. и 0,14 (0,12-0,22) у.е., $p < 0,05$). При оценке содержания лимфоцитов в крови было установлено, что на 3 и 14 сутки применения ТДП с ЭПО при ТТ количество $CD45RA^+$ и $CD3^+$ в крови статистически значимо не изменяется. На 8 сутки эксперимента содержание $CD3^+$ лимфоцитов в крови увеличивается (2,60 (2,30-3,00) $\times 10^9$ /л, $p < 0,05$), а $CD45RA^+$ лимфоцитов – не отличается от группы животных с ТТ. В условиях применения ТДП с ЭПО при ТТ количество клеток с ранними признаками апоптоза статистически значимо не изменяется на 3 и 8 сутки, снижается на 14 сутки (0,60 (0,35-0,70)%, $p < 0,05$), количество в крови лимфоцитов с поздними признаками апоптоза и/или некроза статистически значимо не изменяется на 3 сутки, снижается на 8 и 14 сутки (соответственно 1,60 (0,75-2,15)% и 0,05 (0,00-0,10)%, $p < 0,05$). Количество в крови интактных лимфоцитов статистически значимо не изменяется на 3 и 8 сутки ТТ и увеличивается на 14 сутки (99,30 (99,20-99,40)%, $p < 0,05$). Полагаем, что пусковыми факторами в механизме действия ЭПО в составе ТДП при ТТ являются его антиоксидантные, антиапопто-

генные, рост клеток-стимулирующие эффекты [4, 5].

Выводы. 1. Установлено, что при экспериментальной ТТ в крови увеличивается количество нейтрофилов, их поглотительная и НСТ-редуцирующая способность, снижается количество $CD3^+$ и $CD45RA^+$ лимфоцитов на 5, 8 и 14 сутки, увеличивается в крови количество лимфоцитов с признаками апоптоза и/или некроза на 3 и 8 сутки.

2. Применение ЭПО в составе ТДП при ТТ не сопровождается изменением количества нейтрофилов в крови на 3, 8 и 14 сутки, приводит к снижению активности фагоцитоза на 14 сутки, интенсивности фагоцитоза – на 8 сутки, активности и интенсивности спонтанного НСТ-теста – на 14 сутки, индуцированного НСТ-теста – на 3, 8 и 14 сутки; увеличению $CD3^+$ лимфоцитов в крови на 8 сутки, снижению количества в крови лимфоцитов с признаками апоптоза и/или некроза на 14 сутки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Осиков М. В., Ахматов К. В., Кривохижина Л. В. Патофизиологический анализ влияния эритропоэтина на психологический статус у больных хронической недостаточностью, находящихся на гемодиализе. Человек. Спорт. Медицина 2010, 19 (195), 110-116.
2. Осиков М. В., Григорьев Т. А., Федосов А. А., Козочкин Д. А., Ильиных М. А. Влияние эритропоэтина на функциональную активность тромбоцитов. Современные проблемы науки и образования 2012, 6.
3. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=7450> (дата обращения: 10.04.2017).
4. Пат. 2611401 Российская Федерация, МПК А 61 К 38/18, А 61 К 47/00. Способ получения лекарственного средства с эритропоэтином местного действия [Текст] / Осиков М. В., Симонян Е. В., Саедгалина О. Т.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России. – № 2015146627; заявл. 28.10.15; опубл. 21.02.17, Бюл. № 6.
5. Dang J. et al. Erythropoietin prevents reactive oxygen species generation and renal tubular cell apoptosis at high glucose level // Biomedicine & Pharmacotherapy. 2010, Vol. 64, 10, 681-685.
6. Strunk T. et al. Erythropoietin inhibits cytokine production of neonatal and adult leukocytes. Acta Paediatrica. 2008, Vol. 97, 1, 16-20.

INDICATORS OF INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY IN EXPERIMENTAL THERMAL INJURY IN THE APPLICATION OF TRANSDERMAL FILMS WITH ERYTHROPOIETIN

Osikov M. V., Simonyan E., Saedgalina O. T., Nikushkina K. V.,
Mezentseva E. A.

*South Ural State Medical University, Russian Ministry of Health,
Chelyabinsk, Russia*

The aim of this work is to investigate the effect of transdermal film (TDF) with erythropoietin (EPO) on the parameters of innate and adaptive immunity in experimental thermal injury (TI). The experiment was carried out on 70 white nonlinear Mature rats, which were divided into 3 groups: 1 (n=10) – intact control, 2 (n=30) –TI, 3 (n=30) –TI with the imposition of TDF with EPO. TI IIIA degree with an area of 3.5 % was modeling by immersion of the site interscapular region of the animal in clean water with a temperature of 98-99°C for 12 s. the Study was performed at 3rd, 8th and 14th days TI. The number of neutrophils in the blood was determined by hematological analyzer “Medonic – M 16” (Sweden). The absorption ability of neutrophils blood was examined using of latex particles, the oxygen-dependent metabolism in spontaneous and induced NST-test. With the help of a flow cytometer “Navios” in the blood determined the number of CD3⁺ and CD45RA⁺ lymphocytes. The death of lymphocytes was assessed by staining cells with fluorochrome conjugated with annexin V (Annexin-5-FITC) and 7-aminoantipyrine D (7-AAD). It was found that experimental TI in the blood increases the number of neutrophils, their phagocytic and NST-reducing ability, reduced number of CD3⁺ and CD45RA⁺ lymphocytes at 5th, 8th and 14th days, increases in blood lymphocyte count with evidence of apoptosis and/or necrosis at 3rd and 8th days. The use of EPO in the composition of TPF in the TI did not accompanied by a change in the number of neutrophils in the blood at 3rd, 8th and 14th days, leads to a decrease in phagocytosis activity at day 14th, the intensity of phagocytosis – on the 8th day, activity and the intensity of spontaneous NST-test at day 14th, the induced NST-test – 3rd, 8th and 14th days; increase of CD3⁺ lymphocytes in the blood on the 8th day, the reduction in the number of blood lymphocytes with signs of apoptosis and/or necrosis at 14th day.

Key words: thermal injury, transdermal film, erythropoietin, immune