

Тимченко Л.Д.,
Затона Е.Г.,
Походенко М.В.

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ РАЗНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ КОЖИ У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС РЕПРОДУКТИВНОГО И ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОГО ПЕРИОДА ОНТОГЕНЕЗА

Аннотация. Известно, что раневые повреждения сопровождаются нарушениями всех звеньев иммунитета. Ключевая роль в поддержании гомеостаза, воспалении и заживлении принадлежит лимфоцитам. Динамика функциональной активности лимфоцитов как у старых, так и животных репродуктивного периода при различных повреждениях кожи возрастает под влиянием новых биологически активных препаратов «Биорегенерин» и «Биокомфорт» по сравнению с традиционно используемыми препаратами и средствами медицинского назначения и совпадает с интенсивностью регенерации.

Ключевые слова: регенерация, повреждение, лимфоцит, онтогенез, биологически активные препараты «Биорегенерин-гель» и «Биокомфорт».

В настоящее время не существует обобщенной теории, касающейся особенностей взаимосвязи механизмов восстановительных процессов, охватывающей все звенья их регуляции. Особое внимание привлекает проблема, связанная с участием иммунной системы в регуляции процессов регенерации [2]. Ключевую роль в иммунных реакциях играют лимфоциты, принимая участие в процессах, направленных на поддержание гомеостаза, регуляцию интенсивности воспаления, заживление, васкуляризацию тканей, компенсаторную гиперплазию и, возможно, регуляцию общего роста различных органов [3]. Они обладают также способностью получать и перерабатывать информацию обо всех специфических, видовых, индивидуальных и тканевых белках, вырабатывая толерантность к ним. Т- и В-лимфоциты несут на своей мембране поверхностные антигенные маркеры - (Cluster of Differentiation) кластеры дифференцировки, отражающие фенотип клеток [6]. В настоящее время идентифицировано свыше 130 маркерных молекул клеточных мембран лимфоцитов. Так, на мембране тимических Т-лимфоцитов экспрессируется специфический рецептор для распознавания антигена, включающий молекулу CD3. Последняя состоит из трех пептидных цепей и обеспечивает передачу сигнала о взаимодействии с антигеном в глубь клетки. В зависимости от особенностей антигенпредставляющей клетки, функционирующей в комплексе с тимоцитами, на их мембране экспрессируются либо маркеры CD4, комплементарно реагирующие с молекулами МНС-II, либо CD8, связывающийся с собственными МНС-I. В последующем из CD4-лимфоцита в периферических тканях образуются Т-хелперы, а из CD8-тимоцитов образуются субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов. Субпопуляции Т-лимфоцитов CD8 и CD4 являются очень важными в функциональном плане. CD4 Т-лимфоциты в основном участвуют в осуществлении иммунного ответа или индуцируют его, регулируют дифференцировку В-лимфоцитов и образование антител, активируют макрофаги, участвуя в заживлении повреждений, образовании новых капилляров, регенерации тканевых волокон. CD8 Т-лимфоциты распознают и разрушают клетки, инфицированные вирусами или поврежденные за счет воздействия внешних факторов. На мембранах В-лимфоцитов экспрес-

сируются молекулы CD19, которые ответственны за развитие гуморального ответа на тимусзависимые антигены [6].

В связи с вышеизложенным представляет интерес оценка динамики функциональной активности лейкоцитов при разных типах повреждений кожи у животных различного возраста. Исследования проведены на белых лабораторных крысах линии Wistar репродуктивного и заключительного этапа онтогенеза. Для этого было создано 4 группы животных (по n=30). В первую и вторую группу вошли животные репродуктивного возраста. Третья и четвертая группа включала животных заключительного этапа онтогенеза. Всем животным наносили повреждения различной интенсивности и характера под эфирным наркозом. В 1-ой и 2-ой группах у лабораторных крыс в области заживка моделировалась резаная рана кожного покрова и мышц одинакового размера. Животным первой группы рану ушивали обычным хирургическим шелком, а животным второй группы такой же хирургической нитью, пропитанной новым биологически активным препаратом «Биорегенерин-гель», изготовленным нами на основе активированной эмбрионально-яичной массы. Животным 3-й и 4-й групп скарифицировали кожу в области заживка. В третьей группе применяли официальный препарат - мазь «Заживин», а в четвертой, разработанный нами препарат «Биокомфорт», в основе которого также лежит эмбрионально-яичная масса и фитоэкстракты. Животные 1, 2, 3, 4 группы выводились из эксперимента на 2, 4, 10 сутки. Для оценки динамики функциональной активности Т- и В- лимфоцитов крови в процессе лечения мы использовали метод прямой иммунофлюоресценции, основанный на иммунофенотипировании лимфоцитов. В качестве реактива использовался флюоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ), дающий в ультрафиолетовых лучах зеленоватое свечение. При наблюдении в люминесцентном микроскопе клеток, обработанных мечеными антителами, отмечали характерные светящиеся ободки, указывающие на то, что на поверхности данной клетки экспрессированы соответствующие дифференцировочные антигены (кластеры дифференцировки).

Результаты оценки функциональной активности лимфоцитов у животных репродуктивного периода при порезах кожи представлены в таблице 1.

Таблица 1

Функциональная активность лимфоцитов в крови лабораторных крыс линии Wistar репродуктивного возраста при резаных ранах

	CD 3	CD4	CD8	CD19
До эксперимента (n=60)	18,6% ± 0,46%	12,04% ± 0,35%	6,68% ± 0,24%	15,66% ± 0,37%
2 сутки	После эксперимента			
1 группа (n=10)	51,39% ± 0,35%	35,05% ± 0,49%	36,89% ± 0,62%	28,13% ± 0,35%
2 группа (n=10)	65,1% ± 0,43%	23,15% ± 0,27%	44,83% ± 0,78%	82% ± 0,98%
4 сутки				
1 группа (n=10)	68,01% ± 0,72%	39,9% ± 0,37%	37,06% ± 0,54%	37,54% ± 0,43%
2 группа (n=10)	80% ± 0,65%	47,2% ± 0,64%	29% ± 0,38%	47,62% ± 0,51%
10 сутки				
1 группа (n=10)	85,28% ± 0,78%	41,35% ± 0,31%	50,8% ± 0,76%	41,73% ± 0,56%
2 группа (n=10)	48% ± 0,65%	32,34% ± 0,25%	19,8% ± 0,34%	37,1% ± 0,38%

1 группа - животные с хирургической нитью;

2 группа – животные с хирургической нитью, пропитанной новым препаратом «Биорегенерин»

Установлено, что уровень экспрессии CD3 Т-лимфоцитов до эксперимента составил $18,6\% \pm 0,46\%$. На 2-е сутки после эксперимента в 1-ой группе он повысился в 2,8 раза, а во 2-ой группе в 3,5 раза. На 4-е сутки в 1-ой опытной группе произошло повышение значения данного показателя, относительно 2-х суток в 1,3 раза, а во второй группе в 1,2 раза. На 10-е сутки в 1-ой группе уровень экспрессии увеличивается в 1,25 раза по отношению к 4-м суткам и составляет $85,28\% \pm 0,78\%$, а во второй группе в 1,7 раза меньше, чем на 4-е сутки.

Уровень экспрессии CD4 Т-хелперов до эксперимента составил $12,04\% \pm 0,35\%$. На 2-е сутки в первой группе он повысился в 3 раза, во 2-ой группе - в 2 раза, относительно значений, полученных до эксперимента и составил $35,05\% \pm 0,49\%$ и $23,15\% \pm 0,27\%$ соответственно. На 4-е сутки его значение в 1-ой группе возросло в 1,1 раза относительно результатов, полученных на 2-е сутки, и составило $39,9\% \pm 0,37\%$. Во 2-ой группе - увеличилось в 2 раза и составило $47,2\% \pm 0,64\%$. В первой группе на 10-е сутки продолжается повышение уровня экспрессии CD4 Т-лимфоцитов и составляет $41,35\% \pm 0,31\%$, что в 1,04 раза выше показателя, полученного на 4-е сутки. Во второй группе значение этого критерия снижается относительно 4-х суток в 1,5 раза и составляет $32,34\% \pm 0,25\%$.

Показатель CD8 - цитотоксических Т-лимфоцитов до эксперимента составил $6,68\% \pm 0,24\%$. На 2-е сутки эксперимента в первой группе уровень экспрессии CD8 Т-киллеров составил $36,89\% \pm 0,62\%$, во второй группе - $44,83\% \pm 0,78\%$. На 4-е сутки значение антигенного маркера CD8 в 1-ой группе незначительно увеличилось относительно показателей, полученных на 2-е сутки эксперимента, и составило $37,06\% \pm 0,54\%$, в то время как во 2-ой группе отмечается уменьшение данного показателя в 1,5 раза и составляет $29\% \pm 0,28\%$. На 10-е сутки уровень экспрессии CD8 - цитотоксических Т-лимфоцитов в 1-ой группе вновь возрастает до $50,8\% \pm 0,76\%$, что в 1,4 раза выше показателя CD8, полученного на 4-е сутки. Во второй группе его значение на 10-е сутки снизилось в 1,5 раза и составило $19,8\% \pm 0,34\%$.

Уровень экспрессии CD19 В-лимфоцитов составил до эксперимента $15,66\% \pm 0,37\%$. В первой группе на 2-е сутки исследования наблюдается повышение поверхностного антигенного маркера до $28,13\% \pm 0,35\%$, что в 1,8 раза выше исходного показателя, а во 2-ой группе значение увеличивается в 5,2 раза и составляет $82\% \pm 0,98\%$. К 4-м суткам в первой группе происходит повышение уровня CD19 В-лимфоцитов до $37,54\% \pm 0,43\%$, что в 1,3 раза выше показателя, полученного на 2-е сутки, а во 2-ой группе уменьшается в 1,7 раза и составляет $47,62\% \pm 0,51\%$. На 10-е сутки его значение в 1-ой опытной группе составило $41,73\% \pm 0,56\%$, что в 1,1 раза выше аналогичного критерия, полученного на 4-е сутки, а во второй группе - $37,1\% \pm 0,38\%$, что в 1,3 раза ниже показателя CD19, полученного на предыдущие сутки эксперимента.

Таким образом, при сравнении динамики функциональной активности лимфоцитов крови у лабораторных животных репродуктивного периода выявлено, что на 2-е сутки в обеих опытных группах наблюдается увеличение общего числа Т-лимфоцитов, в том числе Т-хелперов и Т-киллеров, а также В-лимфоцитов, однако наиболее существенное увеличение показателей на данные сутки отмечается во 2-ой опытной группе, что свидетельствует о более раннем и выраженном иммунном ответе по сравнению с первой группой. На 4-е сутки у животных первой группы отмечается нарастание иммунной реактивности в ответ на повреждение и заключается в повышении количества Т-хелперов, субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов. Однако, несмотря на активацию иммунитета, его уровень в этой группе не достигает уровня аналогичных показателей у животных, которым применяли хирургическую нить, пропитанную препаратом «Биорегенерин-гель». Результаты, полученные на 10-е сутки в первой

группе, свидетельствуют о том, что организм продолжает обеспечивать иммунный ответ на достаточно выраженное повреждение, а показатели, полученные у животных 2-ой группы уже приближаются к зафиксированным до эксперимента. Подобная динамика иммунного ответа совпадает с клинической картиной и динамикой регенерации в обеих группах. Так во 2-й группе к 10 дню отмечено полное восстановление поврежденных тканей и нормализация общего состояния животного, в то время как в первой группе полного заживления не произошло, что сопровождалось расхождением раневых краев, выделением раневого экссудата или нагноением.

Динамика функциональной активности лимфоцитов после скарификации кожи у крыс заключительного этапа онтогенеза представлена в табл. 2.

Таблица 2

Функциональная активность лимфоцитов в крови лабораторных крыс линии Wistar в заключительном периоде онтогенеза при скарификации кожи

	CD 3	CD4	CD8	CD19
До эксперимента (n=60)	31,92%±0,063	12,65%±0,064	18,8%±0,036	15,6%±0,02
2 сутки	После эксперимента			
3 группа (n=10)	64,71%±0,023	42,78 %±0,065	21,84%±0,068	42,18%±0,049
4 группа (n=10)	73,63%±0,01	54,9 %±0,005	18,72%±0,04	36,54%±0,01
4 сутки				
3 группа (n=10)	71,30%±0,45	29,16 %±0,026	42,12%±0,033	15,62%±0,045
4 группа (n=10)	79,29%±0,065	54,33 %±0,058	24,8%±0,002	59,86%±0,009
10 сутки				
3 группа (n=10)	51,26%±0,08	19,51%±0,004	31,5%±0,004	22,33%±0,064
4 группа (n=10)	43,45%±0,001	18,13 %±0,014	25,23%±0,087	18,07%±0,05

3 группа - животные, которым применяли мазь «Заживин»;

4 группа – животные, которым применяли новый препарат «Биокомфорт»

Уровень экспрессии у старых животных CD3 Т-лимфоцитов до эксперимента составил 31,92%±0,063. На 2-е сутки в 3-ей группе он поднялся в 2 раза, а в 4-ой группе он повысился в 2,3 раза. На 4-е сутки значение в 3-ей группе повысилось в 2,2 раза относительно результатов, полученных до эксперимента, а в 4-ой группе уровень экспрессии увеличился в 2,4 раза. В третьей группе на 10-е сутки наблюдается снижение уровня экспрессии CD3 Т-лимфоцитов и составляет 51,26%±0,08, что в 1,6 выше значения, полученного до эксперимента. В четвертой группе на 10-е сутки исследования уровень поверхностного антигенного маркера приближается к значению, зафиксированному до эксперимента, и составляет 43,45%±0,001.

Уровень экспрессии CD4 Т-хелперов до эксперимента составил 12,65%±0,064. На 2-е сутки в 3-ей группе он повысился в 3,4 раза, а в 4-ой группе - в 4,3 раза относительно результатов, полученных до эксперимента. В 3-ей группе на 4-е сутки происходило снижение значения данного показателя в 1,5, а в 4-ой группе уровень экспрессии CD4 Т-лимфоцитов остается на том же уровне относительно вторых суток. На 10-е сутки в третьей группе уровень экспрессии CD4 снижается до 19,51%±0,004 и приближается к фиксированным результатам до эксперимента. Такая же динамика на 10-е сутки эксперимента отмечена и в четвертой группе.

Уровень экспрессии CD8 – цитотоксических Т-лимфоцитов составил до эксперимента 18,8%±0,036. В третьей группе на 2-е сутки исследования наблюдается повышение поверхностного антигенного маркера в 1,2, в 4-ой группе остается на том же уровне

относительно результатов до эксперимента. В третьей группе на 4-е сутки происходило повышение данного показателя в 2,4 раза по сравнению с показателем, полученным до эксперимента, а в четвертой группе - увеличение в 1,4 раза. На 10-е сутки значение CD8 в 3-ей опытной группе превышает исходное значение в 1,8 раза, а в 4-ой группе – в 1,4 раза выше показателя, полученного до эксперимента, и приближается к исходному значению.

Показатель CD19 В-лимфоцитов до эксперимента составил $15,6\% \pm 0,02$. На 2-е сутки эксперимента в 3-ей группе в 2,7 раза выше значения, полученного до эксперимента, а в 4-ой группе уровень экспрессии CD19 В-лимфоцитов на 2,3% выше исходного значения. На 4-е сутки значение антигенного маркера CD19 в 3-ей группе равнялось исходному уровню, а на 10-е сутки достоверно увеличивается до $22,33\% \pm 0,064$. В четвертой группе значение данного показателя на 4-е сутки в 3,8 раза выше показателя, полученного до эксперимента, а на 10-е сутки уменьшилось относительно 4-х суток в 3,3 раза, и приблизилось к значению, полученному до эксперимента.

Таким образом, при сравнительной оценке динамики функциональной активности лимфоцитов под влиянием биологически активных препаратов при скарифицировании кожи у лабораторных крыс линии Wistar в заключительном периоде онтогенеза установлено, что на 2-е сутки в обеих опытных группах наблюдается увеличение общего числа Т-лимфоцитов, в том числе Т-хелперов и Т-киллеров, а также В-лимфоцитов. Однако наиболее существенное увеличение показателей на данные сутки отмечается в 4-ой опытной группе, что свидетельствует о более высокой интенсивности иммунных реакций уже в начале лечения, по сравнению с первой группой. В то же время в третьей группе повышение общего числа Т-лимфоцитов продолжается до 4-х суток, тогда как в 4-й группе уже в это время отмечаются признаки снижения интенсивности иммунного ответа.

Уже на 10-е сутки в обеих экспериментальных группах количество Т- и В-лимфоцитов снижается и приближаются к значениям, зафиксированным до эксперимента. Однако положительная динамика изучаемых показателей при использовании препарат «Биокомфорт» выражена больше, чем при использовании мази «Заживин».

Подобная динамика иммунологической реакции соответствует клинической картине и динамике регенерации в обеих группах. Так, к 10 суткам в 4-ой опытной группе скарифицированная поверхность кожи полностью восстанавливалась и нормализовалось общее состояние животного. А в 3-ей группе к этому сроку полного восстановления поврежденной ткани у большинства животных не происходило.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что динамика функциональной активности лимфоцитов у животных репродуктивного и заключительного этапах онтогенеза при различных типах повреждения кожи возрастает под влиянием новых биологически активных препаратов «Биорегенерин» и «Биокомфорт» по сравнению с традиционно используемыми препаратами и средствами медицинского назначения, и совпадает с интенсивностью регенерации. Подобный факт указывает на высокую регуляторную роль иммунных реакций в патогенезе раневого повреждения и дополняет сведения о механизме действия новых препаративных форм на основе активированных эмбриональных и растительных тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алекперов Р.Т. Иммунная система и регенераторные процессы / Р.Т. Алекперов, Л.П. Мягков // Клиническая медицина. - 1991. - Т. 69. - № 6. - С. 17-23.
2. Fidler I.G. // Biomedicine. - 1980. - Vol. 32. - P. 1-3.
3. Клиническая иммунология. Руководство для врачей / Под ред. акад. РАМН Е.И. Соколова. - М.: Медицина, 1998. - 272 с.
4. Игнатов П.Е. Иммунология и инфекция / П.Е. Игнатов. - М.: Время, 2002. - 352 с.

5. Тотолян А.А. Клетки иммунной системы / А.А. Тотолян, И.С. Фрейдлин. - СПб: Наука, 2000. - 231с.
6. Петров Р.В. Иммунология / Р.В.Петров. - М.: Медицина, 1987. — 416 с.
7. Квачахия Л.Л. Дозозависимые иммунные эффекты риботана при экспериментальной ожоговой травме / Л.Л. Квачахия, В.А. Лазаренко, И.А. Моновцов // Вестник новых медицинских технологий - 2006. - Т. 13. - № 13. - С. 31-32.
8. Ярилин А.А. Симбиотические взаимоотношения клеток иммунной системы / А.А. Ярилин // Иммунология. - 2001. - № 4. - С. 16-20.

L.Timchenko, E. Zatona, M. Pohodenko,

ESTIMATION OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF LYMPHOCYTES UNDER INFLUENCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE PREPARATIONS AT DAMAGES OF THE SKIN AT LABORATORY RATS OF REPRODUCTIVE AND FINAL PERIOD ONTOGENESIS

Abstract: It is known, that wound damages are accompanied by infringements of all parts of immunity. The key role in maintenance of a homeostasis, an inflammation and healing belongs lymphocytes. Dynamics of functional activity лимфоцитов as at old, and animals of the reproductive period at various damages of a skin, grows under influence of new biologically active preparations «Bioregenerin» and «Biocomfort» in comparison with traditionally used preparations and means of medical purpose and coincides with intensity of regeneration.

Key words: regeneration, damage, lymphocytes, ontogenesis, biologically active preparations «Bioregenerin-gel» and «Biocomfort».