

В.Н. Александров^{1,2}, А.А. Кондратенко¹,
Е.В. Михайлова², С.В. Кромский², Л.П. Сигарева²,
М.И. Елисеева¹, Н.В. Пак¹, В.А. Горичный¹

Патогенетические факторы травмы и посттравматический иммунодефицит

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

Резюме. Освещаются проблемные вопросы патогенеза посттравматического иммунодефицита на системном уровне в условиях экспериментальной модели тяжелой механической травмы. Установлено, что в ответ на патогенетические факторы травмы заметно меняется уровень накопления антителообразующих клеток в организме животных, иммунизированных T-зависимым антигеном. Так, болевая афферентация из поврежденных тканей сопровождается достоверным ограничением накопления антителообразующих клеток в ответ на стимуляцию T-зависимым антигеном. Кровоплазмпотеря также обладает достоверным иммуномодулирующим эффектом. Причем конечный результат кровопотери в части ее влияния на гуморальный иммунный ответ зависит от ее тяжести. Кровопотеря в пределах 20% объема циркулирующей крови сопровождается стимуляцией гуморального иммунного ответа, а потеря крови, превышающая 20% объема циркулирующей крови, – супрессией образования антителообразующих клеток в селезенке мышцей, иммунизированных эритроцитами барана. Исследование роли гипоксии в патогенезе посттравматического иммунодефицита с использованием калибровочной кривой, отражающей соотношение показателя карбонатной буферной системы и гуморального иммунного ответа, показало наличие явной корреляции между показателями кислотно-основного состояния и иммунного ответа, а также подтвердило достоверный иммуносупрессорный эффект гипоксии при тяжелой механической травме. Токсемия, как оказалось при анализе сыворотки травмированных животных, также обладает заметным иммуномодулирующим действием, зависящим в своем конечном результате от времени исследования сыворотки после перенесенной травмы – стимулирующим ее действием в отношении иммунного ответа в первый час и супрессирующим через сутки после травмы. Таким образом, мощными иммуносупрессорными патогенетическими факторами тяжелой механической травмы являются болевая афферентация, кровоплазмпотеря, гипоксия и токсемия. При этом адекватная патогенетическая терапия, очевидно, способна обеспечить профилактику посттравматического иммунодефицита и сопряженную с ним инфекцию.

Ключевые слова: травма, шок, боль, кровопотеря, гипоксия, токсемия, иммунный ответ, иммунодефицит, антиген, патогенез.

Введение. Известно, что тяжелое состояние пострадавших может быть обусловлено не только шоком, но и осложнениями постшокового периода, прежде всего легочными, нередко заканчивающимися смертью, как манифестациями состоявшегося, резистентного к терапии вторичного посттравматического иммунодефицита. Полагаем, что патогенез посттравматического иммунодефицита на организменном уровне и, соответственно, его патогенетическая профилактика не могут быть вскрыты без анализа реакции иммунной системы на патогенетические факторы травмы: 1) неадекватную (прежде всего болевую) афферентацию из поврежденных тканей; 2) кровоплазмпотерю; 3) поступление в кровь биологически активных веществ; 4) гипоксию [2]. Каковы же иммуномодулирующие эффекты этих факторов не вообще, а при конкретной механической травме? Каков удельный вклад в развитие иммуносупрессии при конкретной травме каждого из этих факторов, какой из них является основным патогенетическим фактором в патогенезе посттравматического иммунодефицита и в какой мере ответы на эти вопросы могут составить основу для профилактики посттравматического иммунодефицита и в конечном итоге профилактики инфекции у иммунокомпromетированного хозяина? Ответы на эти вопросы искали посредством анализа

оценки патогенетических факторов травмы в становлении посттравматического иммунодефицита на экспериментальной модели тяжелой политравмы.

Цель исследования. Оценить влияние патогенетических факторов тяжелой механической травмы на иммунный ответ.

Задачи исследования.

Оценить влияние болевой афферентации, кровоплазмпотери, гипоксии, токсемии на иммунный ответ при тяжелой механической травме.

Сделать заключение о принципах профилактики посттравматического иммунодефицита.

Материалы и методы. В качестве экспериментальных животных было использовано 140 самок мышей – гибридов (CBA×C57Bl6)F₁. Мышей содержали в стандартных условиях вивария и в работе с ними руководствовались требованиями приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» [5]. Работа с животными выполнялась согласно директивам Европейского сообщества и Хельсинкской декларации [3, 4]. Животные получали политравму во враща-

ющемся металлическом барабане. При вращении мыши поднимались его выступами на высоту 40 см и, будучи неспособными удерживаться в силу своей обездвиженности (лапки перед включением барабана фиксировали пластырем), получали удары при многократных падениях. Использовали животных, перенесших до 450 оборотов – число оборотов, сопровождающихся гибелью 30–40% животных. Для характеристики травмы оценивали общее состояние и показатели кислотно-основного состояния (КОС) крови выживших мышей микрометодом Аструпа на аппарате «Микроаструп» (Дания). Состояние тимико-лимфатической системы забитых цервикальной дислокацией животных исследовали на гистологических срезах, окрашенных гематоксилином-эозином. Гуморальный иммунный ответ оценивали, используя методику локального гемолиза в геле агарозы [8]. Учитывали число антителообразующих клеток (АОК) в селезенке или на 10^6 спленоцитов на пятые сутки после иммунизации тимусзависимым антигеном – эритроцитами барана (ЭБ), вводимыми в боковую вену хвоста в концентрации 2×10^6 в объеме 0,5 мл среды 199.

Роль болевой афферентации в модуляции иммунного ответа оценивали по накоплению АОК в селезенке мышей, перенесших травму, на фоне наркотического анальгетика пифурбена. Препарат вводили внутривенно в лечебной дозе 5 мг/кг в объеме 0,5 мл 0,85% раствора натрия хлорида. Об изменении болевой чувствительности судили по двигательному компоненту ноцицептивного ощущения (сгибанию стимулированной конечности). Травму наносили при отсутствии сгибания конечности в ответ на электрокожное ее раздражение силой тока в два порога с помощью полупроводникового электростимулятора «УСП-1».

Роль кровопотери в генезе посттравматического иммунодефицита оценивали с помощью построенной калибровочной кривой: объем кровопотери – гуморальный иммунный ответ (рис. 1).

На втором этапе, определив объем кровопотери при травме, сопровождающейся стойкой супрессией гуморального иммунного ответа на ЭБ, по калибровочной кривой (см. рис. 1) определяли соответствующий кровопотере уровень иммунного ответа (точка а и б). Для построения калибровочной кривой у мышей из боковой вены хвоста однократно выпускали кровь в количестве 10, 20, 30, 40, 50, 60 процентов от объема циркулирующей крови (ОЦК). Эквивалентное заданной кровопотере количество крови вычисляли по формуле:

$$v = M \cdot 0,0066 \cdot H,$$

где M – масса тела в г; H – первая цифра объема заданной кровопотери.

Данная формула отражает известную зависимость, описанную для мышей: M тела – M крови = 5,4 – 8,2 ($M = 6,6$). На следующие сутки после кровопотери животных иммунизировали ЭБ.

В данном эксперименте в качестве модельной травмы использовали модель синдрома длительного сдавления (СДС). Выбор данной модели был предопределен, во-первых, простотой определения объема кровоплазмопотери относительно подобной оценки у животных, перенесших политравму, и, во-вторых, доказанностью развития стойкой супрессии гуморального иммунного ответа на антигенную стимуляцию ЭБ [1]. Объем кровоплазмопотери при СДС исследовали с помощью сконструированного приспособления, позволяющего найти разность между объемами конечностей до и после их сдавления, и по формуле определяли объем кровоплазмопотери:

$$v\% = \frac{v_1}{M} * 660,$$

где v_1 – разность между объемом конечностей до и после сдавливания; M – масса тела в г.

Роль гипоксии в патогенезе посттравматического иммунодефицита исследовали с помощью построенной калибровочной кривой, отражающей корреляцию: показатель карбонатной буферной системы (HCO_3^-) – гуморальный иммунный ответ (рис. 2).

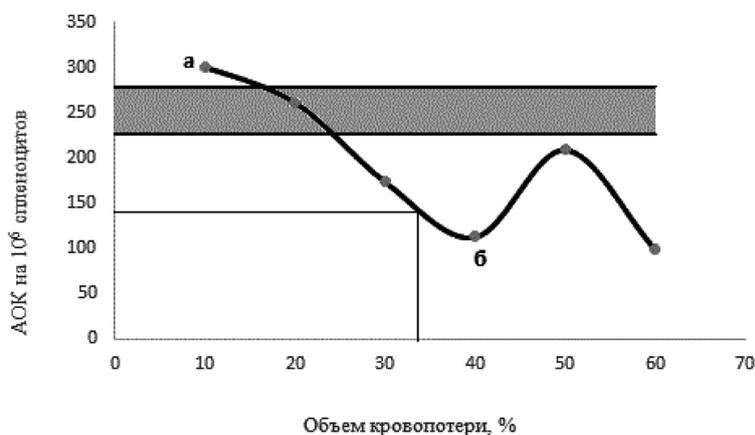


Рис. 1. Калибровочная кривая: объем кровопотери – гуморальный иммунный ответ. Заштрихованная часть рисунка соответствует АОК в селезенке иммунизированных интактных мышей

На следующем этапе, определив HCO_3^- при тяжелой политравме, по калибровочной кривой (см. рис. 2) определяли соответствующий показателю HCO_3^- уровень гуморального иммунного ответа. Для построения калибровочной кривой использовали показатели кислотно-основного состояния (КОС) крови и гуморального иммунного ответа на ЭБ у мышей, перенесших гипоксию. Гипоксию воспроизводили «подъемом» в барокамере мышей на высоту 9500 м со скоростью «подъема» 45 м/с, на которой осуществляли остановку на 5, 10 и 15 мин соответственно. КОС определяли на аппарате «Микроаструп» сразу и на следующие сутки после «спуска». Другую часть животных одновременно с забором крови у первой для определения КОС иммунизировали.

При анализе взаимосвязи между показателями КОС и иммунного ответа была выявлена корреляция. Для HCO_3^- корреляция сохранялась через 24 ч после перенесенной гипоксии, она описана уравнением:

$$A = -185,7 + 15,6 \times \text{HCO}_3^-$$

где А – число АОК на 10^6 спленоцитов; HCO_3^- – концентрация ионов HCO_3^- ммоль/л (в пределах 15–30 ммоль/л использовалась для составления калибровочной кривой).

Роль токсемии в патогенезе посттравматического иммунодефицита оценивали по накоплению АОК в селезенке мышей – реципиентов сыворотки доноров, перенесших тяжелую политравму. Пулированную сыворотку трех мышей, забранную на следующие сутки после травмы, и интактных вводили однократно внутривенно в объеме 0,5 мл на 100 г массы тела вместе с

антигеном ЭБ в объеме 0,5 мл среды 199. Биохимическую принадлежность иммунорегуляторных факторов сыворотки исследовали по чувствительности к температуре (инкубация в течение 1 ч в водяной бане при температуре 56°C) и по чувствительности к ингибитору протеаз – контрикалу (инкубация при температуре 37°C в течение двух часов совместно с контрикалом – 2 каликреин ингибирующих единиц на 0,1 мл сыворотки).

Результаты и их обсуждение. Первые 10–12 ч после травмы животные были угнетены, а выжившие, но агонирующие мыши погибали. Состояние других через сутки хотя и оставалось угнетенным, но улучшалось: появлялись двигательная активность, аппетит и способность дотягиваться до воды в бутылки, установленной в крышке клетки. Смерть животных, судя по данным КОС и газов крови, при вскрытии павших животных была обусловлена прогрессирующими гемодинамическими и дыхательными расстройствами с формированием гипоксемии и гипоксии. Сразу после травмы отмечалось снижение величины истинного рН крови, обусловленное выбросом в кровь кислых продуктов в процессе развития метаболического ацидоза.

К концу первых суток наблюдалась тенденция к нормализации рН за счет достоверного сохранения бикарбоната на фоне повышения парциального давления кислорода. Последнее в свою очередь свидетельствует об уменьшении доли аэробного метаболизма, вероятно, при увеличении интенсивности анаэробного гликолиза.

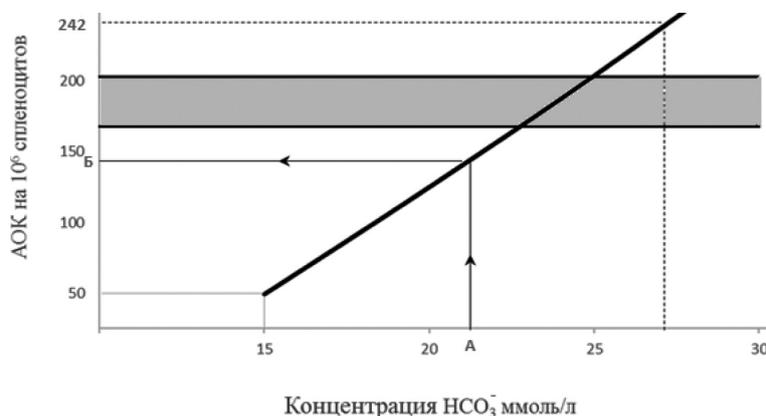


Рис. 2. Калибровочная кривая: HCO_3^- – гуморальный иммунный ответ. Заштрихованная часть рисунка соответствует количеству АОК в селезенке иммунизированных интактных мышей

Таблица 1

Гуморальный иммунный ответ мышей, перенесших травму, на фоне действия наркотического анальгетика

Группа мышей	Число опытов (мышей)	Количество АОК на селезенку	Количество АОК на 10^6 спленоцитов
Интактная	2 (10)	57690±7728	209±28
0,5 мл 0,9% р-ра натрия хлорида + травма	2 (9)	35720±3969	119±18*
0,5 мл наркотического анальгетика+ травма	2 (10)	57720±5364	339±44*

Примечание: различия с показателями мышей интактной и опытной групп, $p < 0,05$.

Морфологическим эквивалентом отмеченных изменений были полнокровие легких, печени, кишечника, подкожные и внутримышечные кровоизлияния, обнаруживаемые при вскрытии. Органы иммунной системы макроскопически выглядели атрофичными. Прогрессирующая атрофия к первым суткам захватывала тимус, лимфатические узлы и селезенку.

Тяжелая политравма на фоне центрального торможения афферентной болевой импульсации наркотическим анальгетиком пифурбеном не сопровождается супрессией гуморального иммунного ответа (табл. 1).

В селезенке мышей, перенесших тяжелую травму на фоне наркотического анальгетика, в ответ на антигенную стимуляцию накапливается равное контролю число АОК, а в пересчете на 10^6 спленоцитов даже большее количество АОК. Иначе говоря, болевая афферентация имеет самостоятельное значение в генезе посттравматического иммунодефицита.

Однократная дозированная острая кровопотеря модулирует иммунный ответ (табл. 2).

В зависимости от объема кровопотери может развиваться как нарастание, так и ограничение нарастания АОК в селезенке иммунизированных животных. Тяжелая степень СДС (сдавление бедер мышей с силой 1800 г/см^2 в течение 4 ч) сопровождается кровоплазмотерией с размождением ткани, соответствующей 20% ОЦК (см. рис. 1), но в то же время стойкой супрессией гуморального иммунного ответа.

Иными словами, в генезе посттравматической иммуносупрессии в представленной модели кровопотеря не участвует. Более того, кровопотеря в объеме, меньшем 20%, но не в совокупности с другими патогенетическими факторами травмы должна сопровождаться стимуляцией гуморального иммунного ответа. Только при кровопотере, превышающей 20% ОЦК, становится неоспоримым ее вклад в патогенез посттравматического иммунодефицита. Иммунодефицит при этом формируется быстро и носит продолжительный характер. Уже через 2 ч после кровопотери снижается содержание интерлейкина-2 [7], а нормализация иммунного ответа наблюдается не ранее, чем через 3 недели [6].

Показатель карбонатной буферной системы HCO_3^- , как выявили предварительные исследования влияния гипоксии на гуморальный иммунный ответ, находится с последним в корреляционной связи (см. рис. 2).

В зависимости от концентрации HCO_3^- в плазме крови в ответ на антигенную стимуляцию развивается супрессия или стимуляция иммунного ответа. При тяжелой политравме концентрация HCO_3^- составляет $20,8 \pm 1,3$, а при политравме легкой степени этот же показатель равен $27,4 \pm 0,6$ ммоль/л. Легко заметить, что этим данным соответствует в первом случае супрессия, а во втором – стимуляция нарастания АОК в ответ на антигенную стимуляцию (см. рис. 2). Таким образом, гипоксия, развивающаяся при тяжелой политравме, сопровождается угнетением гуморального иммунного ответа и наравне с болевой афферентацией выступает в качестве патогенетического иммуносупрессорного фактора политравмы.

Сыворотка через 1 ч после травмы приобретала тенденцию супрессировать иммунный ответ (табл. 3). Иммуносупрессорный фактор сыворотки имеет белковую природу и, очевидно, относится к протеазам. Во-первых, этот фактор термолабилен (табл. 4), после температурной обработки иммуносупрессорный фактор приобретает свойства иммуностимулирующего фактора. Во-вторых, сывороточный иммуносупрессорный фактор чувствителен к ингибитору протеаз – контрикалу. Преинкубация сывороток травмированных доноров с контрикалом лишает ее иммуносупрессорных свойств (табл. 5).

Заключение. Установлено, что токсемия вместе с болевой афферентацией, гипоксией и массивной кровопотерей являются мощными модуляторами иммунного ответа при тяжелой политравме. В этом контексте можно говорить о возможности патогенетической профилактики посттравматического иммунодефицита – противошоковой терапии, включающей при борьбе с болью, кровопотерей, гипоксией и токсемией препараты с иммунопротективным действием.

Литература

1. Александров, В.Н. Патологические изменения в иммунной системе при тяжелой механической травме / В.Н. Александров, В.К. Кулагин // Воен.-мед. журн. – 1982. – № 8. – С. 21–24.
2. Гуманенко, Е.К. Военно-полевая хирургия: учебник / Е.К. Гуманенко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – С. 205–233.
3. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. – СПб.: Rus-LASA, 2012. – 48 с.
4. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях ETS № 123. – Страсбург, 1986. – 13 с.

Таблица 2

Гуморальный иммунный ответ на ЭБ мышей, перенесших кровопотерю разной степени тяжести

Группа мышей	Число опытов (мышей)	Количество АОК на селезенку	p	Количество АОК на 10^6 спленоцитов	p
Интактная	3 (17)	61435±12700	–	264±53	–
С кровопотерей: 10% ОЦК	3 (14)	72279±12975	>0,05	303±38	>0,05
20% ОЦК	3 (13)	62378±8435	>0,05	278±29	>0,05
30% ОЦК	3 (15)	47507±9106	>0,05	174±24	>0,05
40% ОЦК	3 (14)	43224±8626	>0,05	113 ±18	>0,05
50% ОЦК	3 (11)	62975±11068	>0,05	222±27	>0,05
60% ОЦК	3 (5)	27667±4253	>0,05	124±46	>0,05

Таблица 3

Гуморальный иммунный ответ реципиентов сыворотки мышей, перенесших тяжелую политравму

Показатель	Число опытов (мышей)	Количество АОК на 10 ⁶ спленоцитов	р
Сыворотки интактных мышей	2 (11)	167±14	–
Сыворотки крови мышей, взятой сразу после травмы	2 (10)	227±21	<0,05
Сыворотки крови мышей, взятой через час после травмы	2 (9)	154±16	>0,05
Сыворотки крови мышей, взятой через сутки после травмы	2 (12)	93±14	<0,05

Таблица 4

Гуморальный иммунный ответ реципиентов прогретой сыворотки доноров, перенесших тяжелую политравму

Показатель	Число опытов (мышей)	Количество АОК на 10 ⁶ спленоцитов	р
Прогретые сыворотки интактных доноров	2 (10)	341±27	<0,05
Прогретые сыворотки доноров, перенесших тяжелую политравму	2 (8)	599±76	

Таблица 5

Гуморальный иммунный ответ реципиентов обработанной контрикалом сыворотки доноров, перенесших тяжелую политравму

Показатель	Число опытов (мышей)	Количество АОК на 10 ⁶ спленоцитов	р
Обработанные сыворотки интактных доноров	2 (11)	224±19	>0,05
Обработанные сыворотки доноров, перенесших тяжелую политравму	2 (9)	237±11	

- Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» (зарегистрирован Министерством юстиции Российской Федерации 15 августа 2016 г., регистрационный № 43232). – М., 2016. – 6 с.
- Тимченко, А.С. Особенности иммунного ответа на корпускулярный антиген при геморрагическом шоке / А.С. Тимченко // Клин. хирургия. – 1985. – № 1. – С. 55–56.
- Abraham, E. The role of interleukin 2 in hemorrhage-induced abnormalities of lymphocyte proliferation / E. Abraham, R.J. Lee, Yi-Han. Chang // Circ. Shock. – 1986. – Vol. 18. – № 3. – P. 205–213.
- Jerne, R.N. Plague formation by single antibody-producing cells / R.N. Jerne, A.A. Nordin // Science. – 1963. – Vol. 140. – № 3565. – P. 405.

V.N. Alexandrov, A.A. Kondratenko, E.V. Mikhailova, S.V. Kromsky, L.P. Sigareva, M.I. Eliseeva, N.V. Pak, V.A. Gorichnyi

Pathogenetic factors of trauma and post-traumatic immunodeficiency

Abstract. It is well known that the severe condition of patients can be caused not only by shock, but either by epiphenomenon of post-traumatic shock, mostly pulmonary, quite often ending by death, as a manifestation of a successful treatment-resistant secondary post-traumatic immunodeficiency. On our deep persuasion, based on the analysis of literature, and afterwards own experimental data, pathogeny of post-traumatic immunodeficiency at the level of organism and according to its pathogenetic prophylaxis can not be unsealed without the analysis of reaction of the immune system on the pathogenetic factors of trauma: 1) inadequate (foremost pain) impulsation from the damaged fabrics; 2) blood-plasma loss 3) entering blood of bioactive substances; 4) hypoxia. What are the immunomodulatory effects of these factors, not at all, but in case of specific mechanical injury? What is the specific contribution of each factors to the development of immunosuppression in case of specific injury, which one is the main pathogenetic factor in the pathogenesis of post-traumatic immunodeficiency? There are no publications about the specific role of known pathogenetic factors of trauma in the formation of post-traumatic immunodeficiency. The available data gives an idea about the role of pain afferentation, stress, blood loss, toxemia, hypoxia in modulating the immune response in general, regardless of any type of trauma, and the primary changes in the immune system of patients after assistance, including surgical intervention bearing the risk of developing immunosuppression along with drug therapy. The study of these problematic issues of the pathogenesis of post-traumatic immunodeficiency at the system level in the context of severe mechanical trauma experimental model is provided with sufficient understanding of significance of urgent and adequate assistance in the context of ideas about the role of pathogenetic factors of trauma in the pathogenesis of post-traumatic immunodeficiency.

Key words: trauma, shock, pain, blood loss, hypoxia, toxemia, immune response, immunodeficiency, antigen, pathogenesis.

Контактный телефон: +7-921-935-74-66; e-mail: vmeda-nio@mil.ru