

На правах рукописи

МИРОШНИКОВА Екатерина Александровна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА
ПРИ ПЛАСТИЧЕСКИХ ОПЕРАЦИЯХ**

03.00.04 – биохимия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва - 2006

Работа выполнена на кафедре биологической химии медицинского факультета Российского университета дружбы народов

Научные руководители:

доктор биологических наук,
профессор

Елена Васильевна Лукашева

кандидат биологических наук

Елена Владимировна Михальчик

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Александр Васильевич Максименко

кандидат биологических наук

Анатолий Иванович Деев

Ведущее учреждение:

Научно-исследовательский институт физико-химической медицины

Защита состоится “__” _____ 2006 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.13 при Российском университете дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8, медицинский факультет

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Российского университета дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Автореферат разослан “__” _____ 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.203.13
доктор фармацевтических наук,
доцент

Т.П. Лагуткина

2006 А
5179

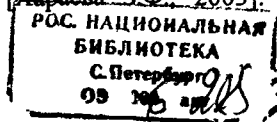
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В связи с растущей популярностью пластических операций расширяются возрастные и социальные группы пациентов, подвергающихся подтяжке тканей лица. При этом в большинстве случаев не проводится тщательное обследование пациентов перед операцией, не ведется биохимический контроль состояния пациентов в постоперационном периоде, пребывание пациентов в стационаре ограничивается 1-2 сутками. Отсутствует также статистика по частоте осложнений после операций.

Реакция неспецифического воспаления в ответ на хирургическую травму зависит от объема вмешательства [Isozaki H., 1999]. По современным представлениям в развитии воспалительного процесса большая роль принадлежит активным формам кислорода (АФК) и азота. При операциях подтяжки мягких тканей лица было выявлено повышение выработки моноцитами перекисных радикалов и фактора некроза опухоли (ФНО) [Панов В.В., 2001]. Известно, что ФНО является стимулятором «дыхательного взрыва» в полиморфноядерных лейкоцитах (ПМЯЛ) и их дегрануляции [Klebanoff S.J., 1986]. Уровень радикал-продуцирующей активности ПМЯЛ может служить удобным критерием для мониторинга развития воспаления [Isozaki H., 1999]. Снижение радикал-продуцирующей активности, в частности, в результате хирургического стресса, может повысить риск септических осложнений [Kehlet H., 1998], поскольку активные формы кислорода и азота (в том числе и радикалы) обладают мощным бактерицидным потенциалом. Другая крайность - гиперактивация лейкоцитов - может повлечь за собой состояние окислительного стресса, характеризующееся окислительным повреждением собственных тканей и органов (в первую очередь, за счет перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран [Mealy K., 1987]). До сих пор не было известно, как влияет подтяжка тканей лица на функциональное состояние ПМЯЛ.

Основной причиной развития воспаления при пластических операциях на лице является травма кожи и мягких тканей. Наиболее распространенными нежелательными последствиями операций по подтяжке тканей лица являются отеки, гематомы, экхимозы. Известно, что отеки сопровождаются хемотаксисом нейтрофилов в зону воспаления и генерацией АФК в коже [Nakamura Y., 1998]. В модельных экспериментах (эксцизионные раны у крыс) наблюдали усиление липидной перексидации и рост активности антиоксидантного фермента каталазы в ткани раны [Звягинцева Т.В., 2000].

Оценка радикал-продуцирующей способности ПМЯЛ могла бы служить важным показателем степени и характера системной воспалительной реакции, вызванной хирургическим стрессом при пластической операции. Риск развития окислительных повреждений существенно возрастает при снижении активности собственных антиоксидантных систем организма, что характерно для тяжелых воспалительных процессов [Хараева З.Ф., 2003]. При этом



наблюдается истощение пула низкомолекулярных антиоксидантов в плазме, снижение транспортной ёмкости альбумина в сыворотке [Степура И.И., 1994], отсутствие активации ферментов-антиоксидантов.

Цель исследования: изучить степень и динамику изменения радикал-продуцирующей активности и миграции в зону повреждения ПМЯЛ пациентов при пластических операциях по подтяжке тканей лица и оценить риск развития окислительного стресса в крови и коже пациентов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние подтяжки тканей лица на радикал-продуцирующую способность лейкоцитов в крови и миграцию их в оперируемую область кожи.
2. Исследовать процессы ПОЛ в плазме пациентов интраоперационно и в постоперационном периоде.
3. Определить уровень антиоксидантной активности плазмы и активности альбуминов сыворотки пациентов интраоперационно и в постоперационном периоде.
4. Оценить влияние подтяжки тканей лица на активность антиоксидантных ферментов в эпидермисе пациентов интраоперационно.
5. Исследовать в эксперименте на модели эксцизионной раны у крыс изменение продукции АФК лейкоцитами в крови и миграцию их в кожу.
6. Изучить динамику изменения активности антиоксидантных ферментов кожи в модели эксцизионной раны у крыс.
7. Оценить возможность регуляции радикал-продуцирующей активности лейкоцитов с помощью экзогенных антиоксидантов при хирургическом стрессе.

Научная новизна. Впервые проведена оценка изменения радикал-продуцирующей активности лейкоцитов крови пациентов при пластических операциях в динамике (интраоперационно и в течение 7 дней после операции). Обнаружено интра- и постоперационное повышение радикал-продуцирующей активности ПМЯЛ, которое зависело соответственно, от продолжительности операции и срока с момента её начала. Выявлено снижение транспортной ёмкости сывороточного альбумина в конце операции и на первые сутки после операции. При этом не наблюдали достоверных изменений содержания продуктов липидной пероксидации – малонового диальдегида (МДА) - и снижения общей антиоксидантной активности в плазме.

Показано, что воспалительная реакция в эпидермисе пациентов характеризуется интраоперационным повышением уровня активности миелопероксидазы (маркерного фермента ПМЯЛ) и каталазы, зависящим от продолжительности операции. Отмечена тенденция к росту активности супероксиддисмутазы.

Исследована динамика общей и местной воспалительной реакции при эксцизионных ранах у крыс. Обнаружен подъем радикал-продуцирующей активности лейкоцитов крови на 4 сутки после операции, снижение общей антиокислительной активности плазмы и рост активности миелопероксидазы в

прилежащих к ране участках кожи. На 4 сутки после операции в коже выявлен рост активности антиоксидантных ферментов – глутатион-пероксидазы и глутатион-S-трансферазы.

Показано, что профилактический прием комплекса на основе витаминов-антиоксидантов и аминокислот обладает способностью восстанавливать уровень общей антиоксидантной активности плазмы и снижать уровень образования радикалов в крови при эксцизионных ранах у крыс после операции.

Практическая значимость результатов работы. Показано, что пластические операции по подтяжке тканей лица вызывают рост образования активных форм кислорода в крови, сопоставимый с эффектом абдоминальных операций. На основании анализа радикал-продуцирующей активности ПМЯЛ периферической крови пациентов дана оценка динамики общей воспалительной реакции. Обнаружено, что активация лейкоцитов компенсируется собственными защитными антиоксидантными системами организма, поскольку в плазме не увеличивалось содержание малонового диальдегида (конечного продукта липидной пероксидации) и не снижалась её общая антиоксидантная активность. В коже рост активности миелопероксидазы ПМЯЛ сопровождался ростом активности антиоксидантного фермента каталазы.

Показано, что активированное состояние лейкоцитов сохраняется как минимум в течение 3-х суток после операции, вследствие чего в этот период повышен риск острого воспалительного ответа на внешнее воздействие (инфекция, травма). К 7-м суткам выявлено снижение функциональной активности лейкоцитов, что увеличивает риск инфекционных осложнений.

В эксперименте показано, что с помощью профилактического приема комплекса витаминов-антиоксидантов и аминокислот можно уменьшить степень активации лейкоцитов крови после операции.

Обнаружено, что местная воспалительная реакция в коже сопровождается подъемом активности пероксид-утилизирующих ферментов. Этот результат может быть использован при направленном подборе местных противовоспалительных препаратов с антиоксидантным действием.

Апробация работы и публикации. Основные результаты диссертационной работы обсуждались на I международной конференции «Кожа и окружающая среда» (Москва - СПб, 2005) и заседании кафедры биохимии РУДН. По материалам диссертации опубликовано 3 тезисов докладов и 2 статьи.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа включает следующие разделы: введение, обзор литературы, главу с описанием материалов и методов исследования, собственные результаты исследования и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Библиографический указатель имеет ___ наименования, из них ___ отечественных и ___

зарубежных источника. Работа изложена на ___ страницах машинописного текста, содержит ___ таблиц, ___ рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе проводили исследование периферической крови и эпидермиса пациентов, подвергшихся пластике лица, а также крови и полнослойной кожи крыс с эксцизионными ранами.

Было обследовано 2 группы пациентов. 1-ая группа была сформирована на кафедре пластической хирургии и косметологии ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава» (25 пациентов), 2-ая – на кафедре реконструктивной и эстетической хирургии ЦНИСС (10 пациентов). Хирургические вмешательства включали подтяжку мягких тканей лица (вертикальную с перемещением поверхностной фасциально-мышечной системой); подтяжку мягких тканей лица с блефаропластикой верхних и/или нижних век; подтяжку мягких тканей лица с липосакцией подбородка; подтяжку мягких тканей лица с липосакцией подбородка и блефаропластикой верхних и/или нижних век. Пациенты 1-ой группы были обследованы до операции, после премедикации и введения наркоза, сразу после операции, и через 20-24 ч после оперативного вмешательства. Интраоперационно у них забирали образцы кожи. У пациентов 2-ой группы брали пробы крови до операции, на 1-е, 3-е и 7-е сутки после операции.

Объем оперативного вмешательства и его травматичность у пациентов двух групп были сопоставимы. Предварительное обследование пациентов ни у кого не выявило признаков воспаления или иммунодефицитного состояния.

Все операции проводились под интубационным наркозом. Премедикация включала дормиком, димедрол, ардуан; индукция анестезии – диприван; поддержание анестезии – фентанил. Продолжительность операций колебалась от 2 ч до 7 ч.

Кровь брали путем венопункции. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (20 ЕД/мл крови). Лейкоциты и нейтрофилы периферической крови доноров и пациентов выделяли, используя градиент плотности фикол-верографина [Фримель Г., 1987]. Для выделения плазмы кровь центрифугировали 5-7 минут при 400 g и собирали супернатант. Оценку радикал-продуцирующей активности изолированных лейкоцитов и цельной крови проводили методом измерения люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ), стимулированной форболмиристатацетатом (ФМА) [Владимиров Ю.А., 1991]. Транспортную способность альбумина плазмы оценивали по результатам определения эффективной концентрации альбумина (ЭКА) и общей концентрации альбумина (ОКА) флюоресцентным методом с помощью набора реактивов «Зонд-альбумин» (производство НИМВЦ «Зонд», Москва) [Добрецов Г.Е., 1994]. Интенсивность ПОЛ оценивали по уровню МДА в

плазме крови в тесте с тиобарбитуровой кислотой [Uyashima M. et al., 1978]. АОА плазмы определяли по методике Клебанова Г. (1990).

Забор образцов иссекаемой кожи проводили через 5-20 мин, 30-150 мин и более 150 мин с момента начала операции. До проведения биохимических анализов образцы кожи хранились при температуре -20° С. Эпидермис соскребали с замороженных образцов и гомогенизировали в ручном гомогенизаторе Поттера. Пробы центрифугировали (5000 об/мин, 20 мин) и в супернатанте оценивали активность миелопероксидазы (МПО) [Bretz U., 1974], каталазы [Aebi H., 1984], супероксиддисмутазы [McCord J., 1993]. Результаты выражали в пересчете на белок, определяемый по методу Лоури [Lowry O.H., 1951].

Для экспериментов *in vitro* использовали кровь здоровых доноров, полученную в отделении переливания крови РДКБ.

Экспериментальную полнослойную эксцизионную рану моделировали у 16 крыс-самцов линии Вистар с массой тела 200-220 г. Под общей анестезией выбривали шерсть и вырезали два квадрата 15×15 мм полнослойной кожи с левой и правой стороны спины животного. Длительность этой операции составляла 15 мин. перевязки проводили под эфирным наркозом в течение 8 дней, каждый раз очищая рану стерильным физиологическим раствором и накладывая свежую герметичную повязку Tegaderm. У крыс забирали кровь (50 мкл) из хвостовой вены до операции и после - на 1-й, 4-й и 8-й день исследования. Биоптаты полнослойной кожи брали на 4-е и 8-е сутки из зоны, прилежащей к ране. В супернатанте гомогената полнослойной кожи оценивали уровень активности МПО, глутатион-пероксидазы (ГП) [Guthenberg C., Mannervik B., 1985], глутатион-S-трансферазы (ГТ) [Капищенко А.И., 1999]. В цельной крови измеряли ХЛ, стимулированную ФМА.

Эффективность комбинации антиоксидантов и аминокислот (КАА) при терапии воспаления, вызванного эксцизионной раной, оценивали на основании измерения ХЛ цельной крови и АОА плазмы у крыс. Животные были разделены на 2 экспериментальные группы. Опытной группе *per os* вводили КАА в дозе 100 мг/кг два раза в день на протяжении 6 дней: за 4 дня до операции, в день операции и на 1-е сутки после операции. Суточная доза КАА содержала 11 мг убихинона, 11 мг витамина Е, 44 мг L-метионина, 11 мг аспартата селена и 123 мг соевого фосфолипидного комплекса. Контрольной группе *per os* вводили 0,9% раствор NaCl по той же схеме. Для измерения ХЛ у животных забирали кровь (50 мкл) из хвостовой вены в следующие моменты времени: до операции, после введения наркоза, в конце операции и на 1-е сутки после операции. Животных декапитировали на 1-е сутки после операции и в плазме крови определяли АОА.

Статистическую обработку проводили с помощью программы «Statistica 6,0» (Statsoft. Znc., США). Результаты выражали через среднее арифметическое значение показателей и стандартное отклонение. Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью непараметрического критерия

Уилкоксона для связанных величин и U теста Манна-Уитни для несвязанных величин. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Для определения корреляционных связей использовали коэффициент линейной корреляции Пирсона и коэффициент корреляций Спирмана (r) [Стентон Гланц, 1999].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинико-лабораторные исследование

Обоснование использования люминол-зависимой хемилюминесценции цельной крови для оценки радикал-продуцирующей активности лейкоцитов (нейтрофилов). Метод ХЛ широко используется для оценки количества радикалов, образующихся в клеточных и бесклеточных системах. В качестве активатора ХЛ при оценке суммарной продукции радикалов лейкоцитами применяется люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион). Радикал-продуцирующую активность лейкоцитов оценивают как после предварительного их выделения (удельная ХЛ изолированных лейкоцитов), так и непосредственно в пробах цельной крови. В последнем случае анализ позволяет учитывать влияние на лейкоциты факторов плазмы и межклеточных взаимодействий, что максимально приближает условия анализа к ситуации в организме. В наших исследованиях проводилась оценка как ХЛ изолированных лейкоцитов, так и ХЛ цельной крови. Предварительно мы проанализировали влияние суммарного количества лейкоцитов в пробе цельной крови (16 – 65 тыс/мл) на величину ХЛ цельной крови и получили линейную зависимость. Этот результат свидетельствует о возможности оценки радикал-продуцирующей активности лейкоцитов на основании прямого пересчета показателя ХЛ цельной крови на количество лейкоцитов (удельная ХЛ цельной крови).

Для крови здоровых доноров с нормальным содержанием лейкоцитов в крови ($n=24$) была получена прямая корреляция между величиной ХЛ ответа изолированных лейкоцитов и величиной удельной ХЛ цельной крови ($r=0,59$; $p=0,003$). Одновременно было показано, что основной вклад в ХЛ лейкоцитов вносят нейтрофилы, так как обнаружена прямая корреляция между удельной ХЛ лейкоцитов и нейтрофилов: $r=0,81$; $n=50$; $p<0,001$.

Традиционно полагают, что источником люминол-активированной ХЛ лейкоцитов является гипохлорит, образующийся в реакции миелопероксидазы азурофильных гранул нейтрофилов с пероксидом водорода [Allen R.C., 1975]. Результаты ингибиторного анализа представленные в таблице 1, показали, что ХЛ цельной крови в норме зависит от взаимодействия люминола не только с гипохлоритом, но и с липопероксидами и оксидом азота, т.е. позволяет регистрировать широкий спектр радикалов.

Таблица 1.

Влияние ингибиторов на люминол-зависимую хемиллюминесценцию цельной крови здоровых доноров

| Ингибитор | Мишень ингибитора | $C_{58\%}$, мМ |
|-------------|--|----------------------|
| Азид натрия | МПО, каталаза, 1O_2 [Root R.K., 1981] | $0,7 \times 10^{-7}$ |
| НДФА | Липоксигеназа [Robert C., 1999] | $7,2 \times 10^{-4}$ |
| L-NAME | NO-синтаза [Yuji N., 1998] | 1,1 |
| Таурин | ClO^- [McGregor J.A., 1988] | 6,6 |

Таким образом, оценка люминол-активированной ХЛ цельной крови является удобным и адекватным методом измерения радикал-продуцирующей активности лейкоцитов в присутствии других компонентов крови.

Влияние подтяжки мягких тканей лица на люминолзависимую хемиллюминесценцию ПМЯЛ. Оценка генерализованной реакции организма на хирургическую травму при операциях подтяжки тканей лица позволила выделить следующие закономерности.

ХЛ ответ цельной крови и выделенных лейкоцитов зависел от продолжительности операции. Так, была выявлена корреляционная связь между длительностью операции и ХЛ цельной крови ($r=0,72$, $n=15$, $p=0,003$), а также длительностью операции и удельной ХЛ изолированных лейкоцитов ($r=0,55$, $n=16$, $p=0,028$). Полученные данные сопоставимы с результатами исследования гастроэнтерологических операций. В ходе нашей работы было установлено, что при операциях по подтяжке тканей лица, длящихся более 5 ч, ХЛ цельной крови увеличивалась в 2,8 раз по сравнению с исходными значениями ($p<0,05$), а при эзофагэктомии и гастрэктомии такой же продолжительности - в 2,5 раза [Isozaki H., 1999].

Максимальное повышение ХЛ цельной крови наблюдалось на 1-е сутки после операции (табл. 2). Пересчет этого показателя на абсолютное количество лейкоцитов (удельная ХЛ цельной крови) выявило повышение не только числа лейкоцитов в крови, но и их активности. Максимальную активность лейкоцитов крови зарегистрировали на 3-е сутки после операции и в это же время фиксировали наиболее интенсивное развитие клинических признаков воспаления (отека, экхимоз, гематом). К 7-м суткам наблюдалось снижение ХЛ цельной крови. Исследования ХЛ изолированных лейкоцитов не выявили достоверного изменения этого показателя в течение первых 3-х дней после операции (табл. 3).

Таблица 2.

Изменение ХЛ цельной крови и общего числа лейкоцитов пациентов интраоперационно и в постоперационном периоде

| | ХЛ цельной крови, В | Количество лейкоцитов в крови, $\times 10^6$ клеток/мл | Удельная ХЛ цельной крови, В/тыс лейкоц |
|------------------------------|---------------------|--|---|
| 1-ая группа | | | |
| До операции | 1,4 \pm 0,5 | 6,4 \pm 0,9 | 15,8 \pm 9,0 |
| Начало операции (с наркозом) | 1,3 \pm 0,4 | 4,9 \pm 0,3 | 17,9 \pm 8,5 |
| Конец операции | 2,1 \pm 0,8 | 7,6 \pm 3,1 | 24,6 \pm 12,2 |
| 1-е сутки | 2,9 \pm 0,9 * | 9,2 \pm 5,0 | 28,8 \pm 14,1 |
| 2-ая группа | | | |
| До операции | 1,0 \pm 0,3 | 6,4 \pm 2,0 | 16,8 \pm 3,5 |
| 1-е сутки | 3,3 \pm 0,7 * | 11,2 \pm 3,2 * | 31,6 \pm 7,2 * |
| 3-е сутки | 2,5 \pm 0,7 * | 7,1 \pm 2,1 | 39,1 \pm 14,0 * |
| 7-е сутки | 1,8 \pm 0,9 | 6,8 \pm 2,6 | 27,5 \pm 8,5 * |

* достоверно отличается от точки «до операции» в соответствующей группе

Таблица 3.

Показатели хемиллюминесцентного анализа изолированных лейкоцитов

| | Спонтанная удельная ХЛ, В/млн клеток | Активированная ФМА удельная ХЛ, В/млн клеток |
|-------------|--------------------------------------|--|
| До операции | 14,3 \pm 8,3 | 28,3 \pm 9,4 |
| 1-е сутки | 12,8 \pm 6,3 | 38,1 \pm 18,0 |
| 3-е сутки | 9,4 \pm 5,1 | 27,8 \pm 3,0 |
| 7-е сутки | 3,6 \pm 2,5 *, ** | 4,6 \pm 2,6 *, ** |

* достоверно отличается от точки «до операции»

** достоверно отличается от точки «1-е сутки»

На 7-е сутки было обнаружено, что ХЛ выделенных лейкоцитов снижалась в 8,8 раз относительно исходных значений. Описаны случаи, свидетельствующие о развитии иммуносупрессии на 6-9 день после хирургической операции [Mealy K., 1987], что согласуется с нашими данными. Возможно, в этот период в крови появилась большая доля молодых лейкоцитов. Согласно литературным данным, незрелые лейкоциты обладают меньшей функциональной активностью по сравнению со зрелыми [Pallister I., 2004]. В тоже время мы не наблюдали снижения ХЛ цельной крови в этот период. В цельной крови содержится большое количество факторов, стимулирующих активность лейкоцитов: цитокины, простагландины, иммунные комплексы и фрагменты белков системы комплемента [Kato T. et al, 1981].

Таким образом, в результате пластической операции было выявлено изменение радикал-продуцирующей активности лейкоцитов: на 3-е сутки она

достигала максимального уровня, а к 7-м суткам – снижалась относительно нормы. Всплеск радикалообразования в интра- и ближайшем послеоперационном периоде играет защитную роль при возможной бактериальной контаминации раны. С другой стороны, повышенная активация лейкоцитов может привести к травме своих собственных тканей за счет развития окислительного стресса. Наблюдаемое нами угнетение активности лейкоцитов может спровоцировать развитие инфекционных осложнений при дополнительных хирургических и косметических вмешательствах.

Влияние подтяжки мягких тканей лица на эффективную концентрацию альбумина (ЭКА) и общую концентрацию альбумина (ОКА) плазмы. В условиях повышенного уровня образования радикалов нейтрофилами в послеоперационном периоде важную роль приобретает антиоксидантная защитная система организма. Одним из основных компонентов антиоксидантной системы является сывороточный альбумин [Степуро И.И., 1994]. В наших исследованиях после операций на лице эффективная концентрация альбумина (ЭКА) достоверно снизилась уже к концу операции в 1,2 раза по сравнению с исходными значениями и оставалась пониженной в течение первых 24 часов (табл. 4). На 3-и сутки наблюдалось восстановление ЭКА. При этом в интра- и послеоперационном периоде не было зарегистрировано изменения ОКА, так как объем кровопотери во время операции был незначительным. Аналогичные, но более выраженные изменения ЭКА были выявлены при тяжелых механических травмах [Мороз В.В., 2005]. Снижение ЭКА наблюдалось в течение первых 6 ч посттравматического периода, на 1-е сутки ЭКА была в 2,5-3 раза ниже нормы и не восстановилась к 7-м суткам.

Таблица 4.

| Изменение эффективной концентрации альбумина | | | | | | |
|--|---|------------------------------|----------------|------------|-----------|-----------|
| | Эффективная концентрация альбумина, г/л | | | | | |
| | До операции | Начало операции (с наркозом) | Конец операции | 1-е сутки | 3-е сутки | 7-е сутки |
| 1-ая группа | 38,6±8,9 | 41,5±12,3 | 35,8±11,2* | 33,9±12,1* | n.d. | n.d. |
| 2-ая группа | 29,4±2,2 | n.d. | n.d. | 23,0±4,3** | 25,6±3,0 | 25,5±3,7 |

n.d – изменения данного параметра не исследовались

* достоверно отличается от точки «начало операции (с наркозом)»

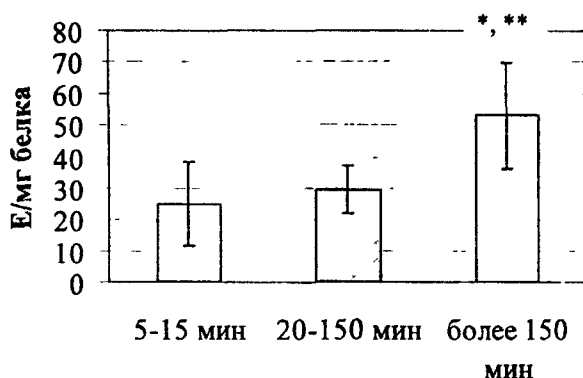
** достоверно отличается от точки «до операции»

Согласно литературным данным, снижение ЭКА свидетельствует о нарушении транспортной способности альбумина, что может увеличивать нагрузку на другие компоненты антиоксидантной системы плазмы.

Анализ уровня МДА и АОА плазмы не выявил изменения этих показателей интраоперационно и в послеоперационном периоде, вплоть до 7-х суток.

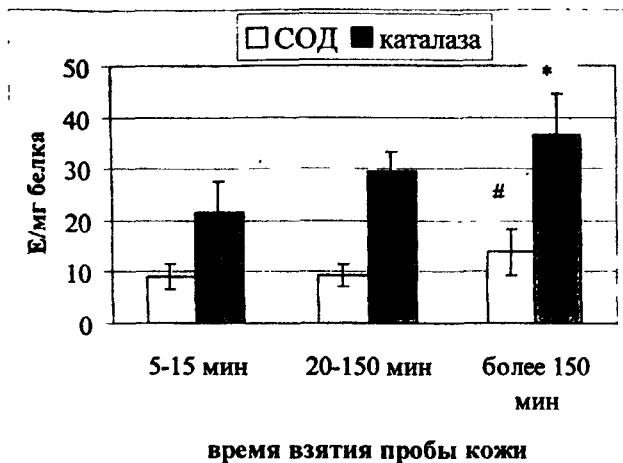
В результате проведенных исследований было показано, что при пластической операции развивается генерализованная реакция организма, выражающаяся в изменении функциональной активности циркулирующих лейкоцитов и транспортной способности альбумина плазмы. В то же время, в процессе пластической операции и в послеоперационном периоде мы не зафиксировали статистически значимых изменений ПОЛ (МДА) и АОА плазмы крови. Таким образом, в результате пластики лица не смещалось равновесие системы «прооксидант-антиоксидант» в крови пациентов.

Влияние подтяжки мягких тканей лица на удельную активность МПО, СОД и каталазы эпидермиса пациентов. На фоне развития неспецифической воспалительной реакции в крови были зафиксированы интраоперационные изменения в эпидермисе зоны оперативного вмешательства. Так, уже в ходе операции происходили изменения свойств кожного лоскута, которые выражались в росте удельной активности МПО, маркерного фермента азурофильных гранул нейтрофилов (рис. 1). Этот факт свидетельствует о быстрой миграции ПМЯЛ в зону повреждения. Одновременно компенсаторно увеличивалась удельная активность антиоксидантных ферментов СОД и каталазы (рис. 2). Повышение активности СОД и каталазы в очаге воспаления наблюдалось также другими исследователями при эксцизионной ране у крыс [Звягинцева Т.В., 2000], а также при химическом ожоге кожи раствором додецил сульфата натрия у человека [Camera E., 2003].



* достоверно отличается от точки «5-15 мин»
** достоверно отличается от точки «20-150 мин»

Рис. 1. Динамика интраоперационного изменения активности МПО в супернатанте гомогената эпидермиса пациентов.

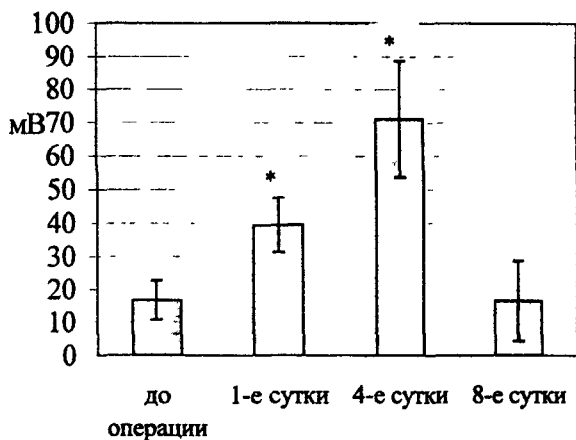


* достоверно отличается от точки «5-15 мин»
 # достоверно отличается от точки «20-150 мин»

Рис. 2. Динамика интраоперационного изменения удельной активности СОД и каталазы в супернатанте гомогената эпидермиса пациентов.

Экспериментально-лабораторное исследование

Экспериментальные и клинические исследования указывают на то, что баланс в системе про- и антиоксидантных реакций в коже и ране может существенно влиять на процессы ранозаживления [Stevens D.L., 1994]. Поэтому было важно оценить адаптационные реакции антиоксидантных ферментов кожи в постоперационном периоде. По понятным причинам эти исследования невозможно провести у пациентов. Для этих целей была смоделирована эксцизионная рана у крыс.



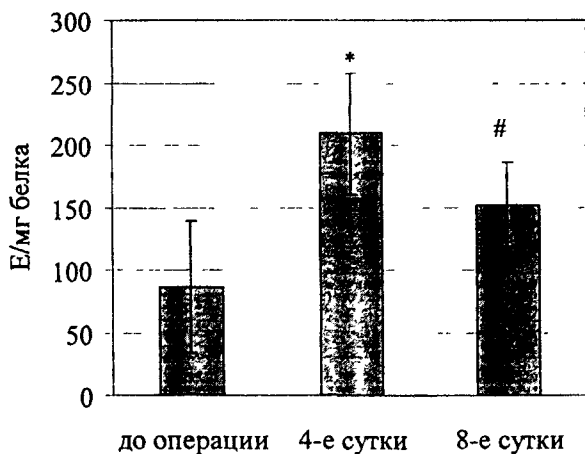
* достоверно отличается от точки «до операции»

Рис. 3. Динамика изменения хемилюминесценции цельной крови крыс в постоперационном периоде.

Экцизионная рана вызывала у животных повышение уровня ХЛ цельной крови в ближайшем постоперационном периоде (рис. 3). Максимальные значения ХЛ-свечения регистрировали на 4-е сутки после травмы, к 7-му дню этот показатель возвращался к исходным значениям, что соответствовало динамике изменения показателя у пациентов.

Изучение АОА плазмы животных показало, что на 1-е сутки после операции этот показатель снижался почти в 3 раза относительно исходных значений ($p < 0,05$), в отличие от пациентов. Различие в реакции АОА на хирургическую травму в клинике и в эксперименте можно объяснить разной площадью травмы (примерно 10% от общей поверхности тела у крыс, в то время как у человека - 1-3%).

Результаты, отражающие изменение удельной активности МПО в коже крыс, прилегающей к ране, отражены на рис. 4. Можно видеть, что на 4-е сутки после операции наблюдалось увеличение этого показателя в 2,4 раза. На 8-й день удельная активность МПО снижалась, но к исходным значениям не возвращалась. Повышение активности этого фермента косвенно свидетельствует о росте окислительной нагрузки на ткань.



* достоверно отличается от точки «до операции»

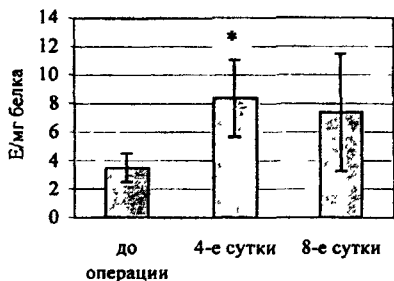
достоверно отличается от точки «4-е сутки»

Рис. 4. Динамика удельной активности МПО в супернатанте гомогената кожи крыс в постоперационном периоде.

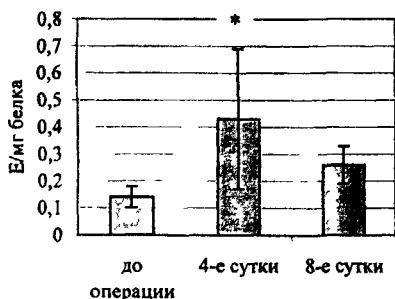
При оценке антиоксидантной системы кожи крыс основными объектами исследования являлись утилизирующие пероксиды и липопероксиды ферменты участков, прилегающих к экцизионной ране. На рис. 5 представлены результаты изменения удельной активности ГП и ГТ в постоперационном периоде. На 4-е сутки значения активности этих ферментов выросли соответственно в 3,1 и 2,4 раза. Этот факт свидетельствует о тенденции ткани преодолеть развившееся воспаление, снизив концентрации

исследования согласуются с работой Steiling H. Et al. (1999), где указано, что заживление эксцизионной раны у мышей сопровождалось увеличением содержания мРНК, отвечающей за синтез селензависимой ГП, СОД и каталазы.

1



2



* достоверно отличается от точки «до операции»

Рис. 5. Влияние эксцизионной раны на удельную активность антиоксидантных ферментов в супернатанте гомогената кожи крыс: 1 – глутатионпероксидаза, 2 – глутатион-S-трансфераза.

Таким образом, в крови животных были зафиксированы признаки окислительного стресса, проявляющиеся в увеличении радикал-продуцирующей способности крови и снижении общей АОА плазмы. Однако в коже, прилегающей к ране, рост активности МПО в постоперационном периоде сопровождался увеличением активности антиоксидантных ферментов ГП и ГТ.

Исследование влияния комбинации антиоксидантов и аминокислот (КАА) на радикал-продуцирующую способность цельной крови

Полученные в клиническом и экспериментальном исследовании результаты позволили наметить направление поиска адекватных лечебных воздействий. *In vitro* и в биологическом эксперименте эксцизионной раны у крыс была исследована КАА, состав которой приведен в разделе «Материалы и методы».

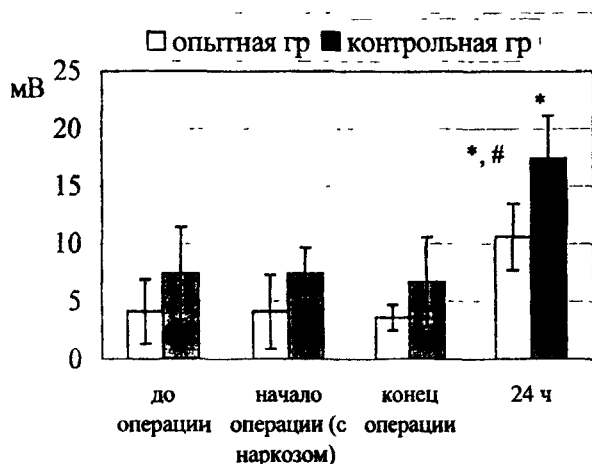
Показано, что препарат в концентрации 10 мг/мл пробы снижает уровень ХЛ цельной крови доноров и крыс, стимулированной ФМА *in vitro* (табл. 5). Этот эффект сохранялся даже после 60-минутной предварительной инкубации проб крови с препаратом КАА.

Таблица 5.

Влияние комбинации антиоксидантов и аминокислот (10 мг/мл пробы) на люминолзависимую хемилюминесценцию цельной крови здоровых доноров и крыс, стимулированную ФМА, *in vitro*

| Время прединкубации | Кровь доноров, % ингибирования | Кровь крыс, % ингибирования |
|---------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 5 минут | 21,5±15,3 (n=6) | 52,8±16,2 (n=5) |
| 60 минут | 26,2±28,6 (n=6) | 65,2±11,7 (n=6) |

Препарат был также протестирован нами в биологическом эксперименте на крысах в модели эксцизионной раны. Эксцизионная рана вызывала у крыс генерализованную реакцию, о чем свидетельствовало повышение уровня ХЛ цельной крови на 1-е сутки после операции (рис. 6). У животных, предварительно принимавших антиоксидантный комплекс, уровень ХЛ цельной крови перед операцией был в 1,8 раз ниже уровня ХЛ животных контрольной группы. На 1-е сутки после операции в обеих группах наблюдался рост продукции радикалов. Примечательно, что у животных, принимавших антиоксидантный комплекс этот рост был меньше в 1,6 раза относительно контрольной группы ($p=0,043$).



* достоверно отличается от точки «до операции» в соответствующей группе

достоверно отличается от контрольной группы

Рис. 6. Изменение хемилюминесценции цельной крови во время операции и через 24 ч у крыс контрольной группы и крыс, получавших КАА.

Таким образом, на фоне приема КАА сохранялась способность лейкоцитов активироваться в ответ на травму, однако степень их радикал-продуцирующей активности снижалась.

сутки в отличие от контрольной группы. Так, на 1-е сутки у контрольной группы АОА снижалась в 3 раза относительно исходных значений, в то время как у опытной группы это снижение не было достоверным (табл. 6).

Таблица 6.

Влияние КАА на антиокислительную активность плазмы крови животных

| | До операции | 1-е сутки |
|--------------------------|-------------|-----------|
| Контрольная группа | 70,0±6,0 | 23,3±4,0* |
| Животные, получавшие КАА | 73,4±5,0 | 66,2±8,0 |

*достоверно отличается от точки «до операции»

Таким образом, КАА уменьшал уровень образования свободных радикалов в крови при хирургическом стрессе и препятствовал падению общей АОА плазмы крови. Результаты, свидетельствующие об антиоксидантной активности препарата хорошо согласуются с данными литературы [Хараева З.Ф., 2003].

Полученные данные свидетельствуют о том, что операции по подтяжке тканей лица сопровождаются системными проявлениями воспаления с усилением выработки свободных радикалов в крови и коже, снижением транспортной способности сывороточного альбумина в послеоперационный период. Результаты исследования указывают на отсутствие повреждения компонентов антиоксидантной системы, что проявлялось в отсутствии изменений ПОЛ и АОА плазмы, а также в компенсаторном увеличении активности антиоксидантных ферментов в коже.

ВЫВОДЫ

1. В процессе операции подтяжки мягких тканей лица (устраненияптоза мягких тканей) и в послеоперационном периоде выявлено повышение уровня продукции свободных радикалов в крови пациентов. Максимальная радикал-продуцирующая активность клеток крови наблюдается на 3-е сутки после операции.

2. На 7-е сутки после операции происходит снижение функциональной активности лейкоцитов, регистрируемой по уменьшению их удельной люминол-зависимой хемилюминесценции (как спонтанной, так и стимулированной форболовым эфиром).

3. Рост радикал-продуцирующей активности крови не сопровождается изменением содержания малонового диальдегида и общей АОА плазмы интраоперационно и после операции (в течение 7 дней), что свидетельствует об отсутствии нескомпенсированных окислительных повреждений в организме.

4. В конце операции и на протяжении суток после операции наблюдается снижение транспортной ёмкости альбумина плазмы, выражающееся в уменьшении числа свободных связывающих центров.

5. В ходе длительной операции, продолжительностью более 2 ч 30 мин, отмечается увеличение активности миелопероксидазы в эпидермисе (в 2,1 раза), что свидетельствует о развитии местной воспалительной реакции. Одновременно в эпидермисе выявлен компенсаторный рост активности каталазы (в 1,7 раз) и тенденция к росту активности супероксиддисмутазы (в 1,5 раза).

6. Экцизионная рана у крыс вызывает повышение хемилюминесценции крови (в 4,2 раза) и рост активности миелопероксидазы (в 2,4 раза) в коже, прилегающей к ране, начиная с 1-х суток после операции. Одновременно наблюдается повышение активности антиоксидантных ферментов: глутатионпероксидазы (в 3,1 раза) и глутатион-S-трансферазы (в 2,4 раза) в коже на 4-е сутки.

7. Профилактическое применение комплекса антиоксидантных витаминов и аминокислот снижает уровень образования свободных радикалов в крови у экспериментальных животных и предотвращает падение общей антиоксидантной активности плазмы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Miroshnikova E.A., Mikhal'chik E.V., Muhamed F., Nerobeev A.I., Korkina L.G. Free radical production, antioxidant enzymes, and inflammatory markers in the blood and skin of the patients subjected to face-lift surgery // Book of abstracts of the 1st international conference "Skin & environment", Moscow-St. Petersburg, Russia, June 1-6, 2005, P. 72.

2. Majorova A., Laschinina E., Miroshnikova E., Ibragimova G., Korkina L. *Ex vivo* effects of glycolic and trichloroacetic acid on activity of superoxide dismutase and catalase in human epidermis // Book of abstracts of the 1st international conference "Skin & environment", Moscow-St. Petersburg, Russia, June 1-6, 2005, P. 69.

3. Лашинина Е.В., Мирошникова Е.А., Ротанов М., Майорова А.В., Коркина Л.Г. Влияние гликолевой кислоты и её комбинации с хлоридом стронция на активность антиоксидантных ферментов эпидермиса // Вестник эстетической медицины. – 2005. - №3. – С. 95.

4. Мирошникова Е., Михальчик Е., Лукашева Е., Мухамед Ф., Неробеев А., Коркина Л. Особенности воспалительной реакции при пластических операциях на лице // Эстетическая хирургия. – 2006. – Т. 5, №2. – С.

5. Неробеев А.И., Мохамед Ф., Мирошникова Е.А., Михальчик Е.В., Коркина Л.Г. Оптимизация результатов лечения пациентов с возрастным птозом мягких тканей лица // Вестник эстетической медицины. – 2005. - №4. С. 14 – 19.

Список использованных сокращений

| | |
|---|---|
| АОА – антиоксидантная активность | ПМЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты |
| АФК – активные формы кислорода | ПОЛ – перекисное окисление липидов |
| ГП – глутатион-пероксидаза | СОД - супероксиддисмутаза |
| ГТ – глутатион-S-трансфераза | ФМА – фоболмирилатацетат |
| КАА – комбинация антиоксидантов и аминокислот | ФНО – фактор некроза опухоли |
| ХЛ – хемилюминесценция | ЭКА - эффективная концентрация альбумина |
| МДА – малоновый диальдегид | L-NAME - N ω -нитро-L-аргинин-метиловый эфир |
| МПО – миелопероксидаза | |
| НДГА - нордигидрогуаретовая кислота | |
| ОКА – общая концентрация альбумина | |

Мирошникова Екатерина Александровна (Россия). Исследование окислительного стресса при пластических операциях.

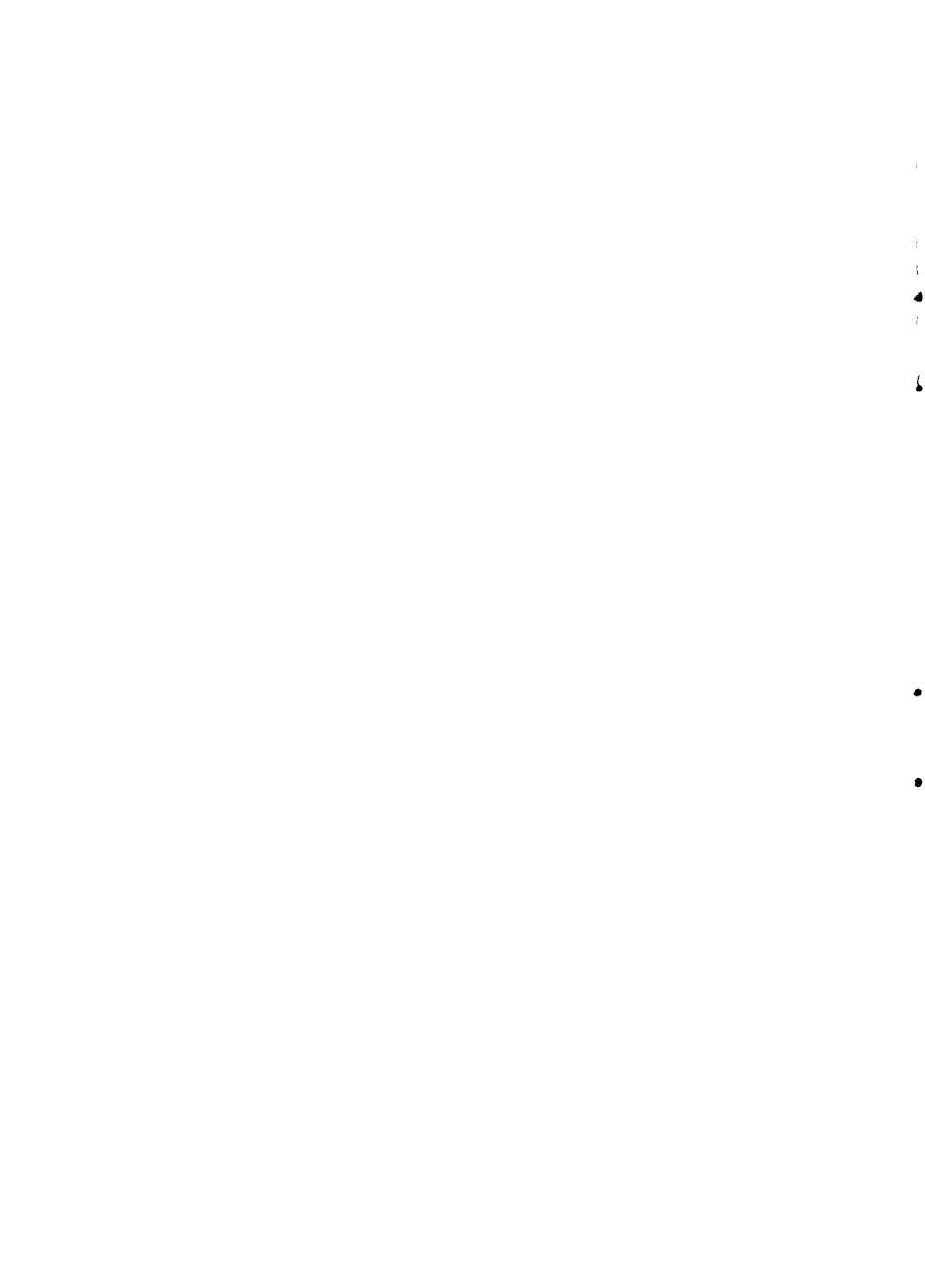
Работа посвящена изучению влияния подтяжки тканей лица на окислительный статус крови и кожи пациентов. Продукцию радикалов нейтрофилами крови оценивали при помощи метода клеточной хемилюминесценции (ХЛ), миграцию нейтрофилов в эпидермис – по уровню удельной активности миелопероксидазы (МПО). Определяли эффективную концентрацию сывороточного альбумина (ЭКА), уровень перекисного окисления липидов (по малоновому диальдегиду, МДА), антиокислительную активность (АОА) плазмы и удельную активность антиоксидантных ферментов в коже. Показана прямая зависимость увеличения ХЛ в крови и МПО в эпидермисе в ходе операции от её продолжительности. Интраоперационно и на 1-е сутки выявлено снижение ЭКА. Не наблюдали повышения уровня МДА и снижения АОА плазмы. В эпидермисе зафиксирован рост удельной активности каталазы и СОД. В модели эксцизионной раны у крыс в постоперационном периоде рост удельной активности МПО сопровождался повышением удельной активности глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Профилактический прием комбинации экзогенных антиоксидантов и аминокислот восстанавливал уровень общей антиокислительной активности и снижал уровень образования радикалов в крови при эксцизионных ранах у крыс через сутки после операции.

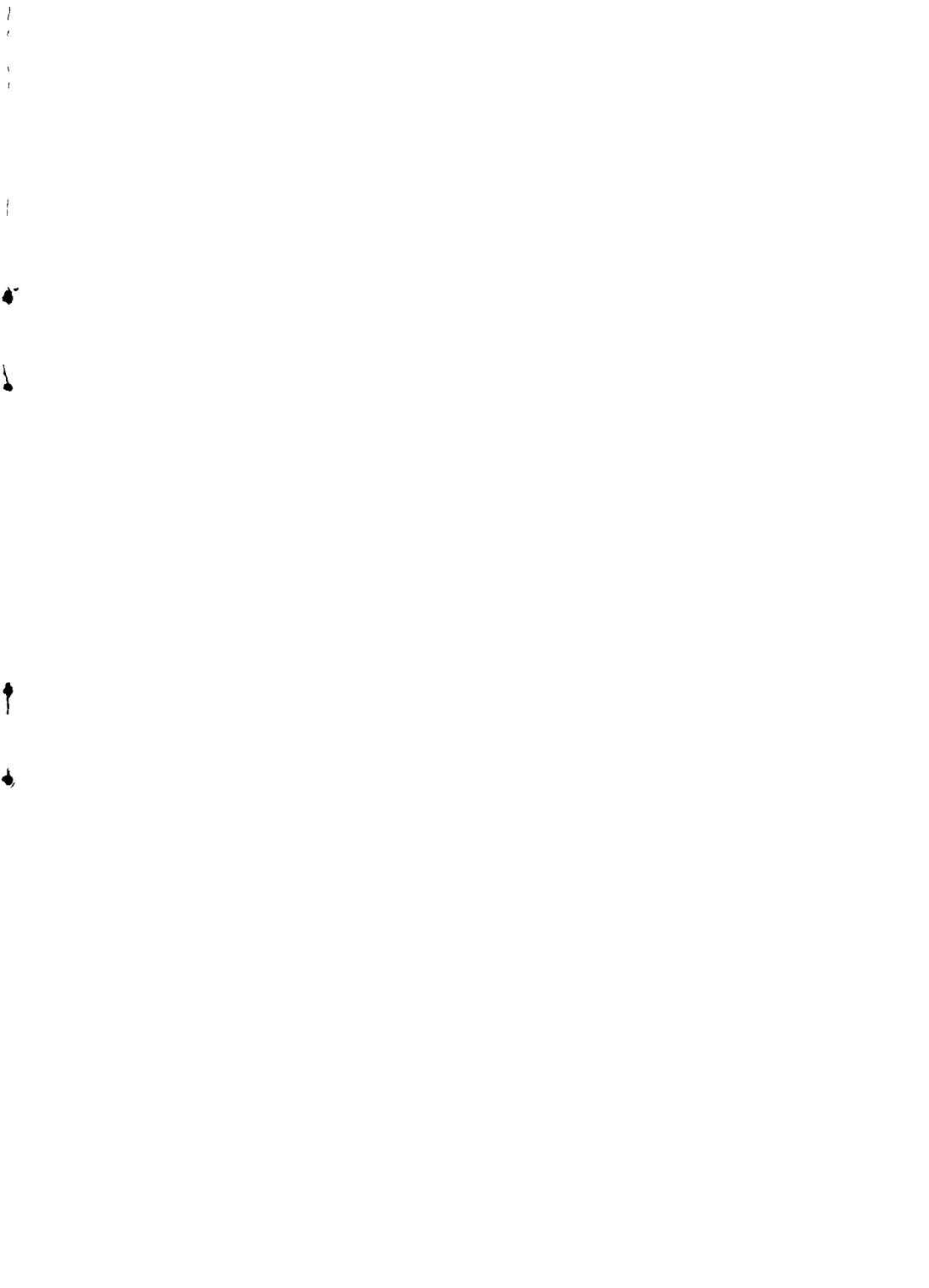
Miroshnikova Yekaterina A. (Russia). The Study of Oxidative Stress under Cosmetic Chirurgical Intervention.

The dissertation is devoted to the problem of influence face-lift surgery on oxidative status of patient's blood and skin. The neutrophil-induced radical production in blood was measured as chemiluminescence (CL), neutrophil migration - as myeloperoxidase activity in epidermis (MPO). We studied effective albumin level (EAL), lipid peroxidation (as malondialdehyde, MDA), total antioxidant activity (AOA) in plasma and antioxidant enzymes activity in the skin flap. We showed that the growth of CL and MPO was directly affected by operation time. During operation and in 24 h EAL dropped below the normal values. There was no change in the AOA and MDA values. Catalase and SOD activity in the epidermis were greater at the end of the operation as compare to the background values. On the model of rat full-thickness excisional wound in the post-op period we found that the growth of MPO activity was accompanied by rise in glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase activity. The prophylactic treatment with antioxidant complex restored the AOA value and diminished the level free radical production in rat blood in 24 h post-op.

Подписано в печать 16 03 06 Формат 60×84/16.
Тираж 100 экз. Усл. печ. л. 1,25. Заказ 165

Типография Издательства РУДН
117923, ГСП-1, г. Москва, ул. Орджоникидзе, д. 3





2006A
5179

W-5179