

Михальчик Елена Владимировна

**ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА
ПРИ ОЖГОВОЙ ТРАВМЕ**

03.00.04 – Биохимия

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

Работа выполнена в отделе молекулярной биологии
Государственного образовательного учреждения
высшего профессионального образования Росздрава
Российский государственный медицинский университет.

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор **Коркина Людмила Георгиевна**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор **Чернов Николай Николаевич**

доктор биологических наук **Теселкин Юрий Олегович**

доктор биологических наук **Панасенко Олег Михайлович**

Ведущая организация:

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «17» ноября 2006 года
на заседании диссертационного совета Д212.203.13 при
Российском университете дружбы народов
(117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГОУ ВПО Российский
университет дружбы народов.

Автореферат разослан «13» ноября 2006 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор фармацевтических наук,
доцент

Лагуткина Т.П. Лагуткина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Высокий риск осложнений при тяжелых ожоговых травмах в настоящее время все чаще связывают с развитием у пострадавших синдрома системного воспалительного ответа [Sheridan R.L., 1998; Самойленко Г.Е., 2000; Шанин Ю.Н., 2003]. Термическая травма вызывает выброс цитокинов и простагландинов, в результате чего усиливается взаимодействие между лейкоцитами, тромбоцитами и клетками эндотелия. Активация лейкоцитов, в первую очередь полиморфно-ядерных (ПМЯЛ), ведет к увеличению образования активных форм кислорода (АФК) и азота, что в сочетании с повышенной адгезией ПМЯЛ к эндотелию создает угрозу окислительного повреждения собственных органов и тканей [Horton J.W., 2003; Roth E., 2004]. С другой стороны, резкое снижение радикал-продуцирующей активности ПМЯЛ может способствовать развитию сепсиса [Саркисов Д.С., 1987]. В норме повышенная продукция АФК компенсируется активацией защитных антиоксидантных ферментов (супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза и др.). Дисбаланс между активностью радикал-продуцирующей и антиоксидантной систем приводит к избытку свободных радикалов, которые играют роль циркулирующих «патологических сигналов», и лежит в основе поражения легких и других внутренних органов [Величковский Б.Т., 2000; Chen L.W., 2003].

Внедрение в клиническую практику ранней некрэктомии (удаление ожогового струпа на 2-6 сутки после травмы) позволило улучшить результаты лечения обожженных и снизить риск гнойно-септических осложнений [Алексеев А.А., 2003]. Однако любая операция может повлечь за собой усиление продукции радикалов лейкоцитами как следствие хирургического стресса [Isozaki H., 1999]. В настоящее время клиническими и экспериментальными исследованиями подтверждается теория «второго удара», которая заключается в том, что преактивированные вследствие травмы ПМЯЛ отвечают на последующее агрессивное воздействие (операция, инфекция) намного сильнее, чем в норме. Поэтому необходима количественная оценка эффектов операций и бактериальной эндотоксемии, способных играть роль «второго удара» при ожогах. На наш взгляд, перспективным методом для таких исследований является клеточная хемилуминесценция крови.

Не менее важную проблему представляет развитие окислительного стресса в ожоговой ране и близлежащих участках кожи. Первичным источником цитокинов и провоспалительных медиаторов при ожогах является зона повреждения,

характеризующаяся усиленной миграцией нейтрофилов [Baskaran H., 2000]. Они очищают область повреждения кожи от продуктов термического распада биомолекул и бактерий при участии АФК. Их азурофильные гранулы содержат фермент миелопероксидазу, который катализирует превращение пероксида водорода в гипохлорит, и рассматривается как маркер миграции нейтрофилов в ткань [Trush M.A., 1994; Xia Y., 1997; Baskaran H., 2000]. Избыток АФК способствует развитию некроза в зоне ожога [Porto da Rocha R., 2002] и повышает уровень липидной пероксидации в кожном лоскуте при пересадках [Goldstein R.K., 1992]. Пероксид водорода снижает жизнеспособность фибробластов и кератиноцитов [Thang P.T., 2001], а индукция антиоксидантных ферментов позволяет им адаптироваться к повышенному уровню образования АФК в ране и на ее краях для того, чтобы активно пролиферировать и дифференцироваться [Steiling H., 1999]. Однако в зоне ожога антиоксидантные ферменты быстро инактивируются [Кораб В., 2003; Naziroğlu M., 2003].

Заживление раны зависит не только от ситуации в очаге повреждения, но и от состояния кожи на краю раны [Troshev K., 1990]. Сегодня очень мало известно о характере изменений в близлежащих неповрежденных участках кожи, хотя выявленное в эксперименте угнетение лактатдегидрогеназы свидетельствует о глубоких метаболических сдвигах в коже при ожогах [Заец Т.Л., 1977]. Это направление исследований представляет научный и практический интерес, поскольку ведет к пониманию механизмов ранозаживления и приживления аутотрансплантатов при тяжелых ожогах.

Таким образом, оценка и коррекция генерализованных и местных сдвигов в равновесии про- и антиоксидантных реакций может рассматриваться как важная составляющая в лечении ожогов, в том числе и хирургическом. Медицина не располагает средствами, способными предотвратить развитие системного воспалительного ответа и полиорганной недостаточности у пациентов с критическими ожогами, и многочисленные экспериментальные исследования направлены на поиск путей защиты органов (антицитокининовые препараты, антиадгезивные препараты). Перспективным представляется использование в этих целях комплексных антиоксидантных препаратов. Одновременно необходимо развивать методы оценки эффективности применения антиоксидантов, пригодные для клинических лабораторий [Шанин Ю.Н., 2003].

В настоящее время одной из наиболее актуальных и социально значимых проблем остается детский ожоговый травматизм, который не имеет тенденции к снижению. В детских ожоговых центрах крайне редко используются методы оценки про- и

антиоксидантных систем крови, что связано главным образом с методическими сложностями и недостаточной проработанностью теоретической базы, отражающей роль АФК в патогенезе ожоговой болезни. Поэтому необходим анализ возможности использования таких методов для мониторинга про- и антиоксидантных сдвигов в крови детей с ожогами.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ:

изучить комплекс нарушений системы антиоксидантной защиты крови и кожи при ожоговой травме, а также обосновать и апробировать метод клеточной хемиллюминесценции цельной крови для мониторинга состояния детей с ожоговой болезнью.

ЗАДАЧИ:

1. Провести комплексное изучение развития окислительного стресса у пациентов с ожогами разной степени тяжести в динамике с целью выбора наиболее информативного показателя.
2. Обосновать применение и апробировать метод хемиллюминесценции цельной крови для оценки тяжести состояния пациентов с ожогами и ожоговой болезнью, в том числе, и на фоне хирургического лечения.
3. В экспериментальной модели ожога у крыс оценить баланс про- и антиоксидантных систем крови и кожи и влияние на него хирургической некрэктомии и эндотоксемии.
4. В экспериментальной модели ожога у крыс оценить миграцию нейтрофилов в ткань легких (по активности тканевой миелопероксидазы) и влияние эндотоксемии на этот процесс.
5. Показать системное защитное действие комплекса экзогенных антиоксидантов при ожогах и послеожоговой эндотоксемии.
6. Оценить местное ранозаживляющее действие фитопрепарата на основе ферментированной папайи, обладающего антиоксидантной активностью.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые проведена оценка хемиллюминесцентной активности изолированных нейтрофилов и цельной крови у детей с ожоговой травмой. Показано изменение активности нейтрофилов в зависимости от стадии заболевания и его тяжести, в том числе, и от развития органных поражений.

Впервые выявлено активирующее воздействие хирургической некрэктомии на хемиллюминесценцию крови, регистрируемое уже в конце операции и возрастающее на 3-и сутки после операции.

Обнаружено стойкое снижение антиокислительной активности и железосвязывающей способности плазмы у пациентов с критическими ожогами, свидетельствующее о дефиците как белковых, так и низкомолекулярных антиоксидантов.

В экспериментальной модели термического ожога у крыс подтверждено повышение хемиллюминесценции крови в ответ на ожог и хирургическую травму кожи, выявлен подъем хемиллюминесценции через 24 часа после введения животным бактериального липополисахарида, показано усиление активности тканевой миелопероксидазы в легких животных под действием ожога и сопутствующей эндотоксемии.

Впервые изучено влияние ожога и эндотоксемии на баланс активности антиоксидантных ферментов и миелопероксидазы в коже вне зоны ожога. Показано, что кожа обладает способностью адаптироваться к местной воспалительной реакции за счет увеличения активности ферментов, в первую очередь, глутатион-пероксидазы и глутатион-S-трансферазы. При этом в зоне ожога на 1-е сутки выявлена резкая инактивация антиоксидантных ферментов с последующим некрозом кожи к 4-м суткам.

Показано защитное действие антиоксидантного комплексного препарата на основе витаминов и аминокислот: в коже - нормализация активности защитных ферментов; в крови - снижение хемиллюминесценции на пике воспаления и предотвращение снижения антиокислительной активности плазмы; в ткани легких - предотвращение роста активности миелопероксидазы как показателя местной воспалительной реакции.

Впервые показано местное ранозаживляющее действие препарата на основе ферментированной папайи.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ

Результаты изучения динамики показателей активности про- и антиоксидантных систем крови детей с ожогами имеют как общее медико-биологическое, так и клиническое значение для понимания патогенеза ожоговой болезни и направленного поиска адекватных антиоксидантных препаратов.

В результате скрининга методов оценки про- и антиоксидантных систем крови детей с ожоговой травмой установлена объективность и информативность метода клеточной хемиллюминесценции цельной крови. Метод не требует длительной процедуры

выделения нейтрофилов и может использоваться как экспресс-метод, в том числе и для определения изменения активности крови в ходе хирургических операций.

Проведенные клиническое и экспериментальное исследования изменения антиоксидантного статуса тканей при ожогах свидетельствуют о необходимости системного и местного применения антиоксидантных препаратов в острый период ожоговой болезни и при проведении хирургического лечения детей с ожогами. Показано защитное действие комплекса экзогенных антиоксидантов при системном применении и фитопрепарата с антиоксидантной активностью при местном применении.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. Глубокие ожоги кожи вызывают системный воспалительный ответ, сопровождающийся ростом активности циркулирующих нейтрофилов. Хемилуминесценция крови адекватно отражает степень активации нейтрофилов. Она зависит от площади глубокого ожога, сроков с момента травмы, тяжести органических поражений и проведения хирургических операций.
2. Ожоговая травма вызывает миграцию нейтрофилов не только в зону ожога, но и в кожу вблизи зоны повреждения, а также в легкие. Миграция нейтрофилов сопровождается изменением антиоксидантных ферментов кожи: в зоне повреждения происходит стойкое снижение активности защитных ферментов, а вне зоны повреждения - постепенное повышение активности глутатион-пероксидазы и глутатион-S-трансферазы.
3. Эндотоксемия усиливает вызываемый ожоговой травмой окислительный стресс, миграцию нейтрофилов в кожные покровы и в легкие.
4. Комплекс экзогенных антиоксидантов снижает интенсивность хемилуминесценции крови на пике послеожогового воспаления, уменьшает степень угнетения антиоксидантной активности плазмы, предотвращает рост активности миелопероксидазы в легких, в том числе при ожогах, осложненных эндотоксемией.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Основные положения работы доложены и обсуждены на Национальной научно-практической конференции с международным участием «Свободные радикалы, антиоксиданты и болезни человека» (Смоленск, 2001), международном симпозиуме «Активные формы кислорода и оксид азота: диагностическое, профилактическое и терапевтическое значение» (СПб – Кизи, 2002); 1-м Конгрессе национального общества детских дерматологов Италии (Рим, 2003); 2-ом Российском конгрессе «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 2003); Всероссийской

конференции “Актуальные вопросы хирургии детского возраста” (Москва, 2004); научной конференции “Фундаментальные и прикладные проблемы экологии человека” (Москва, 2004); 1-ой международной конференции “Кожа и окружающая среда” (Москва-СПб, 2005); 6-м международном конгрессе Европейской Ассоциации детских хирургов (EUPSA, Гданьск, 2005).

По теме диссертации опубликовано 32 научных работы.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена на 234 страницах; иллюстрирована _____ схемами и 49 рисунками, и 35 таблицами. Состоит из введения, обзора литературы, описания объектов наблюдения и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, а также библиографического указателя, включающего 122 источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в период с 1994 г. по 2005 г. на базе отдела молекулярной биологии ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет.

Объекты и методы исследования

Клинические методы исследования

Материалом для исследования служила кровь детей с термической травмой, находившихся на лечении в ДГКБ №9 им. Г.Н.Сперанского (г. Москва). Под наблюдением было 29 детей с ожогами в возрасте от 4 до 14 лет. В зависимости от тяжести травмы выделили три группы. В 1-ю вошли 5 детей с локальными ожогами (0,5-6% общей поверхности тела (ОПТ), глубиной I-II, III, B – IV степени), во 2-ю 12 пациентов с ожогами средней тяжести (15-30% ОПТ, глубиной II-III, A, B – IV), в 3-ю 11 больных с критическими ожогами (35-70% ОПТ, глубиной II-III, A, B – IV). Все пациенты находились на антибактериальной и дезинтоксикационной терапии. Объемы инфузионной терапии зависели от тяжести травмы.

Проводимое врачами 3-го хирургического отделения (зав.отделения – к.м.н. Пеньков Л.Ю.) лечение включало в себя хирургическую некрэктомию с одномоментной или поэтапной аутодермопластикой. Раннее хирургическое лечение осуществляли на 2-7 сутки с момента получения ожога. У 7 пациентов с тяжелыми ожогами исследовали эффекты операций по хирургическому удалению струпа. Продолжительность операций (некрэктомии и тангенциального очищения) составляла в среднем 78 ± 15 мин, объем оперативного вмешательства - $21 \pm 13\%$ от общей поверхности тела.

В качестве антиоксидантного препарата ежедневно рег ос применяли следующий комплекс: убихинон (3 мг/кг), альфа-токоферол (3 мг/кг), метионин (12 мг/кг), селен-аспартат (3 мкг/кг), соевые фосфолипиды (36 мг/кг) (препарат представлял собой готовый комплекс, выпускаемый под маркой «Иммуджен» IDI FARMACEUTICI, Италия, регистрационное удостоверение №002279.И.12.2000).

В качестве местного антиоксидантного средства использовали препарат на основе ферментированной папайи («БиоРекс», Япония, регистрационное удостоверение №003227.И.392.07.2001).

Предварительно антиоксидантная активность исследуемых препаратов была протестирована в модельных клеточных и бесклеточных системах генерации активных форм кислорода.

Забор проб периферической крови осуществляли путем венопункции либо из катетера в динамике: на 1-3 сутки, на 4-7 сутки, на 8-12 сутки, на 13-17 сутки и на 18-24 сутки после травмы. В качестве контроля использовали кровь здоровых детей, направленных на плановую операцию (варикоцеле) и проходивших предварительное обследование в больнице №9 (13 человек, возраст 4-11 лет).

Экспериментальные методы исследования

Моделирование ожоговой травмы у крыс. Ожоговую травму моделировали у 60 крыс-самцов Вистар (400-450 г). Ожоги IIIA, B степени на площади 20% получали, прикладывая к спине животных алюминиевый цилиндр (85°C, 10 сек) [Busch N.A., 2000]. На четвертые сутки формировался струп. В ряде экспериментов струп удаляли хирургически методом тангенциального очищения, что позволяло оценивать площадь раны методом планиметрии и проводить ее обработку фитопрепаратом. При изучении эффектов комплекса экзогенных антиоксидантов («Иммуджен») опытная группа животных получала исследуемый препарат перорально. При изучении местного действия препарата на основе ферментированной папайи («БиоРекс») препарат наносили после удаления струпа на ткань раны под повязку.

Моделирование ожоговой травмы, осложненной эндотоксемией. Ожоговую травму, осложненную эндотоксемией, моделировали у 24 крыс-самцов породы Вистар (400-450 г). Создавали термический ожог кожи как описано выше, а на 4 сутки животным опытной группы интраперитонеально вводили 1 мл раствора липополисахарида *E. coli* O:111 в дозе 1 мг/кг. Животным контрольной группы вводили по 1 мл стерильного физ. раствора. Через 24 ч после введения ЛПС животных выводили из эксперимента

передозировкой барбитуратов. Параллельно моделировали эндотоксемию у здоровых животных.

Моделирование полнослойной эксцизионной раны у крыс. Полнослойную эксцизионную рану у крыс (8 самцов «Вистар» весом 350-400 г) создавали под общей анестезией в строго асептических условиях путем вырезания двух квадратов 15x15 мм с левой и правой стороны спины животного после выбривания шерсти.

Забор экспериментального материала у животных. В ходе экспериментов проводили забор крови из хвоста в пробирки с гепарином и под общей анестезией иссекали биоптат кожи в 10-20 мм от края раны. При выведении животных иссекали ткань раны и ткань легких.

Лабораторные методы исследования

Оценку хемиллюминесцентной активности крови [Lindena J., 1987] проводили на люминометре Wallah Oy 1251 (Финляндия). Результаты выражали в приборных единицах (мВ) в пересчете на 10 мкл цельной крови или млн нейтрофилов.

Нейтрофилы периферической крови доноров и больных выделяли с использованием градиента плотности «фиколл-верографин» [Lindena J., 1988], плазму и эритроциты разделяли центрифугированием (10 мин, 400 г). Гомогенаты кожи и легких получали путем истирания образцов ткани в ручном гомогенизаторе Поттера в 10-кратном избытке фосфатного буфера (рН 7,4), затем образцы центрифугировали (30 мин, 900г) и оценивали активность ферментов в супернатанте.

Антиокислительную активность плазмы крови оценивали по методу Клебанова Г.И. [1990], активность каталазы – по методу Aebi H. [1984] или Бухарина О.В. [2000], активность супероксид дисмутазы - по скорости аутоокисления адреналина [Misra H.P., 1972], активность глутатион-пероксидазы – по окислению восстановленного глутатиона в присутствии трет-бутилгидроперекиси [Гаврялова А.Н., 1986], активность глутатион-S-трансферазы – по скорости образования глутатион-S-2,4 динитробензола [Карпищенко А.И., 1999]. Активность тканевой миелопероксидазы оценивали по окислению орто-дианизидина [Andrews P.C., 1984]. Активность ферментов выражали в пересчете на содержание белка или на содержание гемоглобина. Содержание МДА в гомогенатах оценивали по количеству ТБК-активных продуктов [Uchiyama M., 1978].

Статистическую обработку и расчет корреляционных коэффициентов проводили с использованием пакета программ Statistica for Windows, ver.6. Результаты представляли как $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, а m – стандартное отклонение. Достоверность различий между группами оценивали с использованием критерия Уилкоксона для

связанных величин и U-теста, или t-критерия Стьюдента для несвязанных величин. Достоверным считали различие при $p < 0,05$. Для определения корреляционных связей использовали коэффициент линейной корреляции Пирсона (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Обоснование применения хемиллюминесцентного анализа крови для оценки активности нейтрофилов. Рост хемиллюминесценции цельной крови характерен для стадии ожогового шока [Шанин Ю.Н., 2003], а в течение нескольких недель после травмы сохраняется повышенный уровень хемиллюминесценции изолированных нейтрофилов [Никушкина К.В., 1997]. Поскольку на хемиллюминесцентный ответ крови могут влиять различные ее компоненты [Воейков В.Л., 2003], мы провели сопоставление результатов оценки хемиллюминесцентной активности крови и изолированных нейтрофилов здоровых доноров (Рис. 1-а), а также проанализировали характер связи между хемиллюминесценцией цельной крови и абсолютным количеством нейтрофилов в пробе (Рис. 1-б).

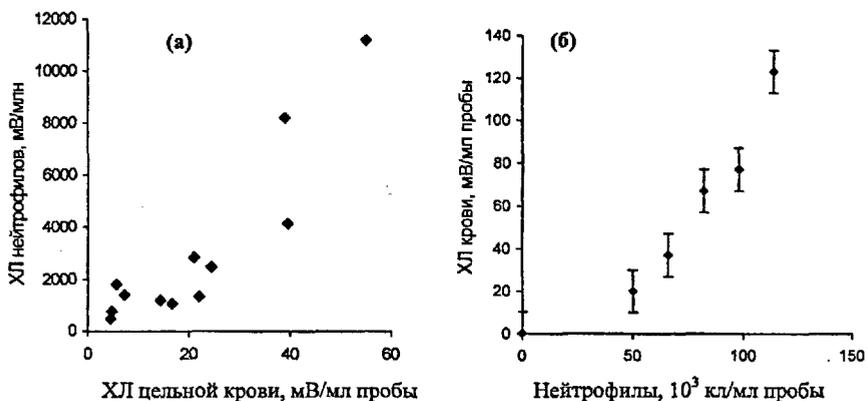


Рис.1. Связь между люминил-зависимой хемиллюминесценцией проб, содержащих цельную кровь доноров (10 мкл/мл) и: (а) - хемиллюминесценцией проб, содержащих изолированные нейтрофилы этих же доноров (10^6 кл/мл); (б) - количеством аутентичных изолированных нейтрофилов, добавленных в пробу с цельной кровью. Ответ стимулировали ФМА (0,1 мкг/мл).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что хемилюминесценция цельной крови зависит от активности и абсолютного количества нейтрофилов, и может применяться как показатель их активности без предварительного выделения клеток.

2. Влияние ожоговой травмы и послеожоговой эндотоксемии на показатели окислительного стресса в крови. В основе окислительного стресса лежит не только увеличение уровня образования оксидантов, но и отсутствие адекватного роста активности защитных антиоксидантных ферментов, что приводит к снижению уровня низкомолекулярных антиоксидантов [Halliwell В., 2004]. Поэтому мы поставили задачей комплексную оценку изменения показателей крови при ожогах, а именно: измерение хемилюминесценции цельной крови (и изолированных нейтрофилов), активности антиоксидантных ферментов эритроцитов и антиокислительной активности плазмы.

При экспериментальных ожогах у крыс площадью 20% поверхности тела мы обнаружили подъем хемилюминесцентной активности крови уже на первые сутки после ожога; максимальные значения наблюдались на 4-е сутки (Рис.2).

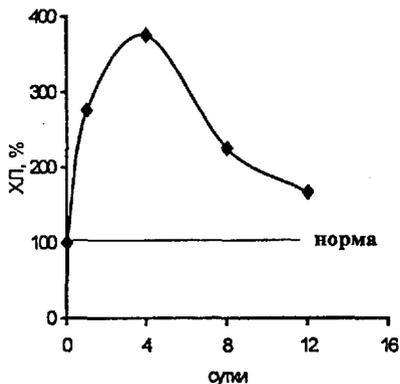


Рис. 2. Хемилюминесценция (ХЛ) крови крыс после ожога в динамике, % от нормальных (до ожога) значений (активатор свечения – люминол (0,2мМ), стимулятор – ФМА (0,1 мкг/мл)). В пробу вносили 10 мкл крови.

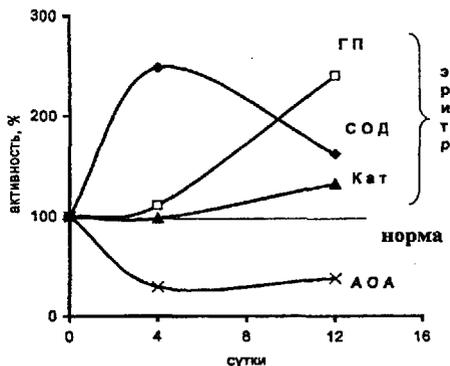


Рис. 3. Динамика изменения активности антиоксидантных ферментов эритроцитов и антиокислительной активности плазмы (АОА) после ожога у крыс, % от нормальных значений.

На 4-е сутки был выявлен дисбаланс в системе антиоксидантной защиты эритроцитов: повышение уровня супероксид дисмутазы при отсутствии роста активности пероксид-утилизирующих ферментов (каталазы и глутатион-пероксидазы) (Рис. 3). Только к 12-м суткам активность этих ферментов достоверно возрастала.

Неизбежным спутником ожоговой болезни является эндотоксемия, а бактериальные липополисахариды известны как предстимуляторы лейкоцитов. Мы моделировали послеожоговую эндотоксемию путем интраперитонеального введения липополисахарида *E. coli* крысам на 4-е сутки после ожога, когда завершалось формирование струпа. В параллельном исследовании липополисахарид вводили здоровым животным.

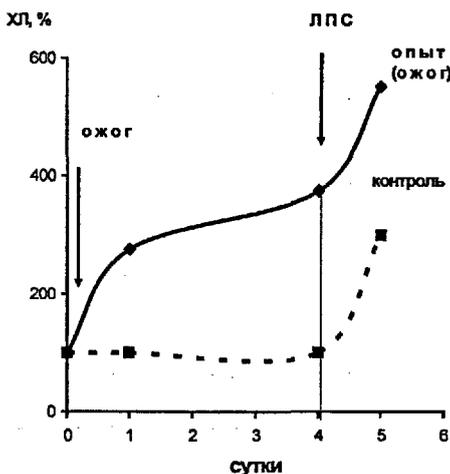


Рис. 4. Изменение люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) крови крыс под действием ожога и введения липополисахарида (ЛПС, 1 мг/кг на 4-е сутки после ожога), % от нормы. В контроле ЛПС вводили здоровым животным.

Как видно на Рис.4, введение липополисахарида вызвало усиление хемилюминесценции крови через 24 ч (5-е сутки после ожога); одновременно снижалась

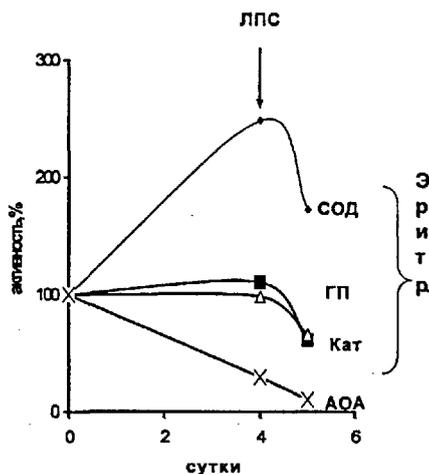


Рис. 5. Изменение активности антиоксидантных ферментов эритроцитов и антиокислительной активности (АОА) плазмы крысы после ожога и введения липополисахарида (1 мг/кг на 4-е сутки после ожога), % от нормы.

активность антиоксидантных ферментов эритроцитов и антиокислительная активность плазмы (Рис.5).

У здоровых животных мы наблюдали рост хемилуминесценции крови, однако, активность антиоксидантных ферментов эритроцитов и АОО плазмы не изменялись. По-видимому, вклад эндотоксемии в развитие окислительного стресса при ожогах связан не только с дополнительной стимуляцией нейтрофилов, но и с нарушением работы антиоксидантной системы.

По данным *клинико-лабораторного исследования*, у детей с термической травмой хемилуминесцентная активность крови достоверно превышала нормальные значения и зависела от тяжести ожога (Рис.6-а).

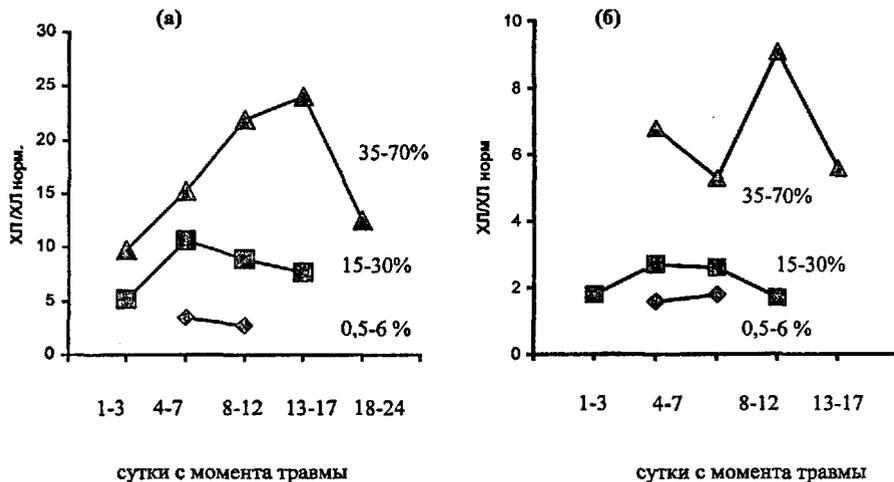


Рис.6. Хемилуминесценция (ХЛ) цельной крови (10 мкл/мл пробы) (а) и изолированных нейтрофилов (10^6 кл/мл) (б) у пациентов с ожогами (относительно нормальных значений): 0,5-6% - локальные ожоги; 15-30% - ожоги средней тяжести; 35-70% - ожоги критические. ХЛ стимулировали ФМА (0,1 мкг/мл) в присутствии люминола (0,2 мМ).

Одновременно было зарегистрировано значительное усиление хемилюминесцентной активности изолированных нейтрофилов (Рис. 7-б) и рост их содержания в крови: при норме $4,7 \pm 0,9$ млн/мл, у пациентов с ожогами средней тяжести показатель повышался до $7,9-11,1$ млн/мл, а у пациентов с критическими ожогами – до $9,5-11,6$ млн/мл.

Максимальные значения люминол-зависимой хемилюминесцентной активности крови у пациентов с ожогами средней тяжести отмечались на 7 ± 2 сутки (в 20-25 раз выше нормы) ($n=10$) и были пропорциональны площади глубокого ожога (Рис. 7-а).

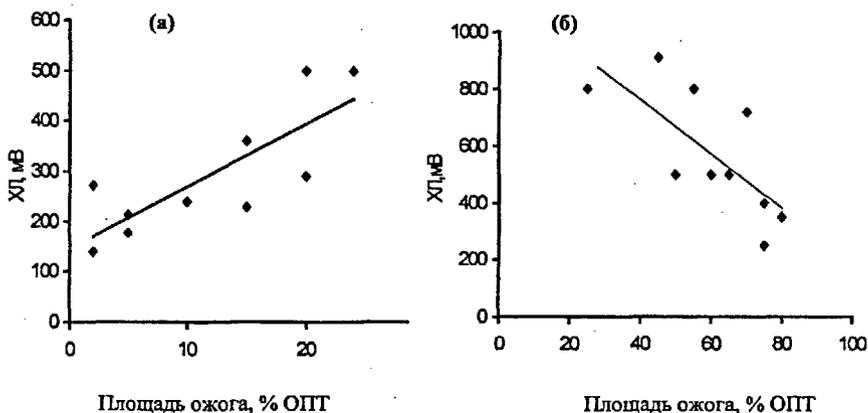


Рис. 7. Связь между максимальными значениями люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) крови и площадью глубоких (IIIА,Б-IV) ожогов:

(а) - у пациентов с ожогами средней тяжести (15-30%): коэфф. корр. 0,91;

(б) - у пациентов с критическими ожогами (35-70%): коэфф. корр. -0,72.

ХЛ стимулировали ФМА (0,1 мкг/мл) в присутствии люминола (0,2 мМ).

У пациентов с критическими ожогами максимумы хемилюминесценции приходились на 8 ± 3 сутки (в 10 раз выше нормы) ($n=10$) и были обратно пропорциональны площади глубокого ожога (Рис. 8-б). При использовании люцитенина в качестве активатора свечения, показатели хемилюминесценции максимально превышали норму в 7,5 раз при критических ожогах и в 4,5 раза - при ожогах средней тяжести (табл.1).

Таблица 1. Динамика люцигенин-зависимой хемилюминесценции цельной крови (ХЛ, мВ) у пациентов с ожогами

Площадь ожога, % ОПП	Сутки с момента ожога				
	1-3	4-7	8-12	13-17	18-24
0,5-6 n=5	-	6,4 ± 1,6*	6,9 ± 3,6*	-	-
15-30 n=12	9,0 ± 1,7*	10,1 ± 4,7*	13,1 ± 5,9*	13,0 ± 9,5*	-
35-70 n=11	11,5±2,3*	10,5 ± 5,9*	16,6 ± 7,1*	23,9 ± 1,4*	8,6 ± 4,1*
Норма n=13	2,9 ± 1,2				

*p<0,05 относительно нормы

Сопоставление данных свидетельствовало об изменении спектра продуцируемых в крови радикалов при ожогах и сдвиге в сторону пероксидных соединений, взаимодействующих в первую очередь с люминолом.

Несмотря на интенсивную инфузионную терапию, мы выявили достоверное снижение АОА плазмы (табл. 2).

Таблица 2. Показатели антиокислительной активности и железо-связывающей способности плазмы в зависимости от тяжести ожоговой травмы и сроков заболевания

Показатель	Ожог, %	Сутки с момента получения травмы					Норма n=13
		1-3	4-7	8-12	13-17	18-24	
ЖСС, мкМ	35-70 n=11	25,5±4,3	17,8±3,3	28,0±8,2	24,2±4,2	29,0±3,9	42,5± 9,5
	15-30 n=12	-	37,5±7,4	58,9±4,6	26,5±3,4	-	
АОА, %	35-70 n=11	25,1±15,6*	31,6±12,3*	36,1±12,4	26,6±10,9*	28,7±7,8*	49,4± 4,1
	15-30 n=12	39,2± 14,3	27,9± 3,4*	28,1±8,7*	30,4± 3,1*	-	

*p<0,05 относительно нормы.

Одновременно было обнаружено стойкое уменьшение железо-связывающей способности (ЖСС) плазмы у пациентов с критическими ожогами, тогда как при ожогах средней тяжести достоверное снижение показателя наблюдали только на 13-17 сутки.

В эритроцитах пациентов с ожогами средней тяжести было зарегистрировано увеличение активности супероксид дисмутазы, тогда как активность глутатион пероксидазы практически не изменялась (табл. 3). У пациентов с критическими ожогами активность супероксид дисмутазы не увеличивалась, а активность глутатион пероксидазы двукратно превышала нормальные значения с первых суток после травмы. При критических ожогах, в отличие от ожогов средней тяжести, наблюдалось усиление активности глутатион-S-трансферазы, что, по-видимому, отражает накопление в эритроцитах продуктов окисления биологических молекул в результате глубокого окислительного стресса.

Таблица 3. Динамика активности антиоксидантных ферментов в эритроцитах пациентов с ожогами разной степени тяжести

Показатель	Площадь ожога	1-3 сутки	4-7 сутки	8-12 сутки	13-17 сутки	18-24 сутки	норма
ГП, ЕД/г гемогл.	35-70 n=11	220 ± 60*	193 ± 57*	209 ± 55*	202 ± 62*	157 ± 44*	94 ± 23
	15-30 n=10	115 ± 57	127 ± 44	119 ± 39	102 ± 45		
ГСТ, ЕД/мг гемогл.	35-70 n=11	1,01 ± 0,25	1,16 ± 0,35	1,56 ± 0,23*	1,42 ± 0,51	1,66 ± 0,55	0,86 ± 0,36
	15-30 n=10	0,77 ± 0,22	0,87 ± 0,15	0,93 ± 0,20	1,02 ± 0,20	-	
СОД, ЕД/мг белка	35-70 n=11	-	60,8 ± 30,0	47,0 ± 20,4	36,7 ± 21,9	31,5 ± 9,1	39,4 ± 12,5
	15-30 n=10	102,9 ± 13,9*	63,0 ± 60,3	73,1 ± 5,4*	106,7 ± 38,7*	107,3 ± 8,2*	

*p<0,05 относительно нормы

3. Риск повреждения внутренних органов при ожоговой травме. Выход активированных нейтрофилов в ткани создает угрозу их окислительного повреждения, ведущего к развитию полиорганной недостаточности. В экспериментальном исследовании анализ активности тканевой миелопероксидазы, маркерного фермента нейтрофилов, выявил достоверный подъем показателя на 4-е и особенно – на 12-е сутки после ожога (Рис.8). Бактериальный липополисахарид дополнительно увеличивал активность миелопероксидазы в легких на 5-е сутки после ожога (через 24 ч после его введения), однако у здоровых животных таких эффектов при введении липополисахарида не наблюдали.

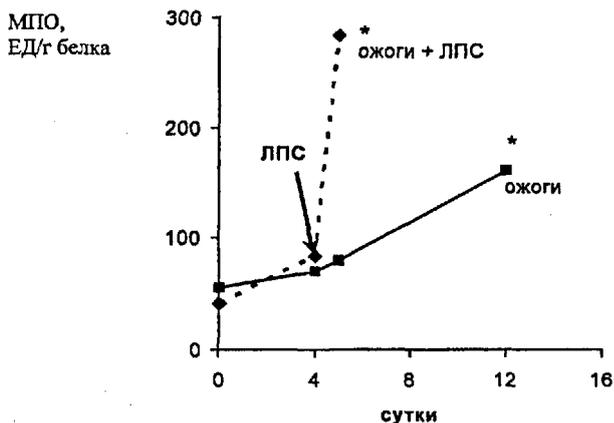


Рис. 8. Влияние ожогов и послеожоговой эндотоксемии на активность миелопероксидазы (МПО) в ткани легких у крыс. Эндотоксемию моделировали внутрибрюшинным введением липополисахарида (ЛПС, 1 мг/кг).

* $p < 0,05$ относительно нормы

Полученные результаты указывают на то, что при ожогах эндотоксемия играет роль «второго удара». Ожог повышает функциональную активность нейтрофилов, в том числе, и их готовность к ответу на последующую стимуляцию. Источником бактериальных липополисахаридов при ожогах могут являться рана [Eski M., 2001] и кишечник [Xia P.-Y., 2002]. Под действием липополисахаридов усиливаются образование АФК нейтрофилами, их выход в ткани и вследствие этого – риск развития органических повреждений.

Учитывая существенный вклад различных патогенетических факторов в уровень продукции АФК нейтрофилами при тяжелых ожогах (травма, эндотоксемия), мы попытались соотнести тяжесть состояния детей с ожогами и уровень прайминга нейтрофилов в их крови, оцениваемый методом хемиллюминесценции цельной крови.

В клинко-лабораторном исследовании были сопоставлены данные о максимальном подъеме хемиллюминесцентной активности крови и выраженности повреждений внутренних органов у пациентов с ожогами (табл. 4).

Таблица 4. Связь между максимальным зарегистрированным уровнем хемилюминесценции (ХЛ) цельной крови и выявленными осложнениями у пациентов с ожогами разной степени тяжести

ХЛ, мВ		Сутки, соответствующие максимуму ХЛ		Кол-во пациентов	Поражение систем органов (число случаев)		Летальный исход (число случаев)
Диапазон	Среднее \pm ст.откл	Диапазон	Среднее \pm ст.откл		Одна система органов	Две и более системы	
100-240	158 \pm 49	4-9	6,3 \pm 1,6	7	1	нет	нет
260-500	403 \pm 101	4-11	7,2 \pm 2,1	10	7	2	2
520-800	781 \pm 67	4-12	8,8 \pm 3,6	4	нет	4	3

В среднем, показатель превышал 400 мВ у пациентов с повреждением одной или более систем органов, а при значениях выше 800 мВ возрастал риск летального исхода.

4. Эффекты хирургического удаления струпа на хемилюминесцентную активность крови. Операции по удалению струпа (некрэктомии) проводятся преимущественно в острый период ожоговой болезни (4-14 сутки), поэтому важно представлять характер их влияния на активность нейтрофилов.

По данным экспериментального исследования, удаление ожогового струпа у крыс на 4-е и 8-е сутки после ожога приводило к более выраженному подъему хемилюминесценции крови (Рис.9), что отражает провоспалительный характер влияния хирургической травмы на лейкоциты.

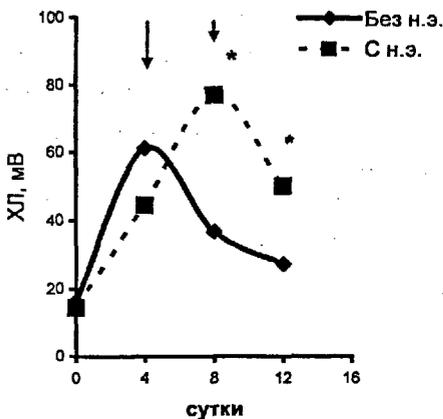


Рис.9. Влияние хирургического удаления струпа (некрэктомии) на динамику хемилюминесценции (ХЛ) крови крыс с ожогами (стрелками указаны сроки некрэктомии)

*- $p < 0,05$ относительно группы «без некрэктомии».

Моделью для изучения эффектов собственно хирургической травмы кожи послужили полнослойные эксцизионные раны у крыс. Как видно на Рис. 10, иссечение кожного лоскута на площади 6 % общей поверхности тела вызывало подъем хемилюминесцентной активности крови в 2 раза.

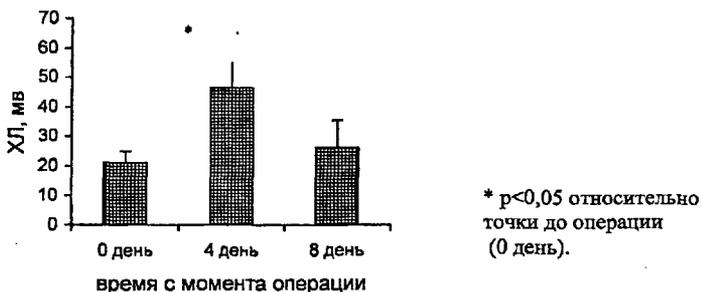


Рис. 10. Динамика люминол-зависимой хемилюминесценции крови, стимулированной ФМА, у крыс при моделировании полнослойной эксцизионной раны.

О развитии окислительного стресса в этих условиях свидетельствовало достоверное снижение антиокислительной активности плазмы (на 4-е сутки показатель был в три раза ниже, чем до операции).

Полученные в экспериментальном исследовании данные указывали на высокую вероятность активации нейтрофилов в результате операции по удалению струпа у пациентов и, следовательно, на необходимость оценки этих эффектов в клинике.

Клинико-лабораторное исследование эффектов семи операций по удалению струпа и обнаружили подъем хемилюминесцентной активности крови к концу операции (в среднем, на 20% от значений до операции) и увеличение показателя на 3-и сутки после операции (5 операций; рост показателя в среднем на 70% от уровня «до операции») (Рис. 11). Поскольку при критических ожогах удаление струпа проводят, как правило, в несколько этапов, оценка послеоперационной активации нейтрофилов могла бы помочь в оптимизации промежутков между операциями.

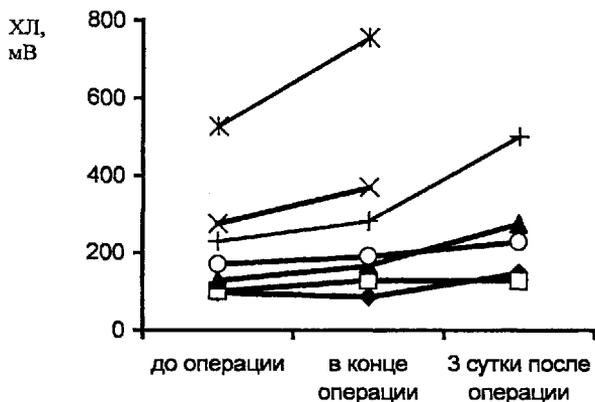


Рис. 11. Влияние хирургической некрэктомии на хемилюминесценцию (ХЛ) крови у 7 пациентов с ожогами (средняя продолжительность операций составляла 78 ± 15 мин, средний объем оперативного вмешательства - $21 \pm 13\%$ поверхности тела).

Хемилюминесцентный анализ цельной крови представляет интерес как интегральный метод, который, по нашим данным, позволяет оценивать реакцию крови на ожог в зависимости от его тяжести, на операции, на эндотоксемию. Необходимость оценки продукции радикалов в крови связана с высоким риском окислительных повреждений вследствие нарушений в системе антиоксидантной защиты крови, особенно при эндотоксемии.

5. Анализ показателей окислительного стресса в коже. Анализ показателей послеожогового окислительного стресса в коже проводился только в экспериментальном исследовании. Изучали свойства обожженной кожи, ткани раны и кожи на удалении 20 мм от зоны повреждения.

Экспериментальные ожоги вызывали резкое усиление активности миелопероксидазы в очаге повреждения (Рис.12-а) с одновременным снижением активности антиоксидантных ферментов, в первую очередь, супероксид дисмутазы и каталазы. При таком же термическом воздействии на кожный лоскут *ex vivo* происходила частичная инактивация каталазы и глутатион пероксидазы, но не супероксид дисмутазы (Рис.12-б).

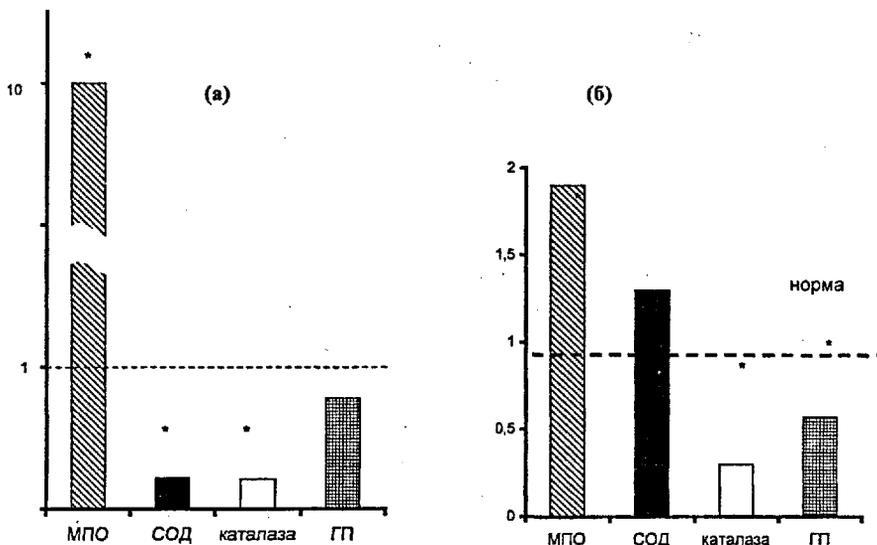


Рис.12. Влияние термического ожога (85°C, 10 сек) на активность миелопероксидазы и антиоксидантных ферментов кожи: (а) через 24 ч после ожога *in vivo*; (б) через 2 часа после ожога *ex vivo*.

* $p < 0,05$ относительно нормы.

Мы предполагаем, что инактивация ферментов кожи *in vivo* является результатом сочетанного действия термического фактора и избыточной продукции оксидантов мигрирующими в очаг нейтрофилами.

К 4-м суткам в очаге происходило формирование струпа, площадь которого соответствовала площади ожога. Анализ ткани струпа обнаружил прямую корреляцию между активностью миелопероксидазы и содержанием малонового диальдегида (Рис. 13), что подтверждало гипотезу о непосредственном участии нейтрофилов и генерируемых ими оксидантов в развитии послеожогового некроза.

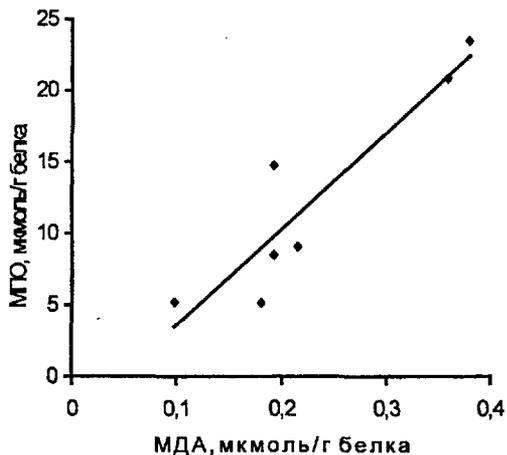


Рис.13. Корреляция между содержанием малонового диальдегида (МДА) и активностью миелопероксидазы в ткани струпа на 4 сутки после ожога у крыс (коэфф. корреляции 0,9).

Вне зоны ожога на первые сутки наблюдался подъем активности МПО при снижении активности супероксид оксидазы и каталазы, однако уже к 4-м суткам активность миелопероксидазы снижалась (Рис.14).

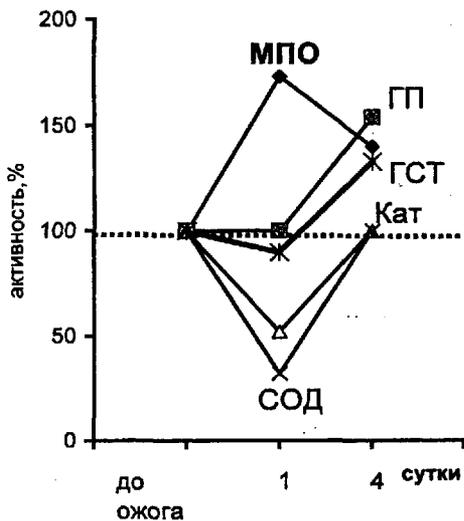


Рис. 14. Изменение активности миелопероксидазы и антиоксидантных ферментов в коже крыс вне зоны ожога (на расстоянии 20 мм от области повреждения) (% от нормальных значений).

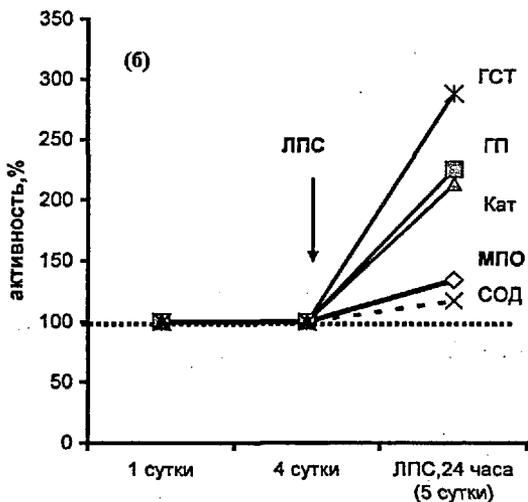
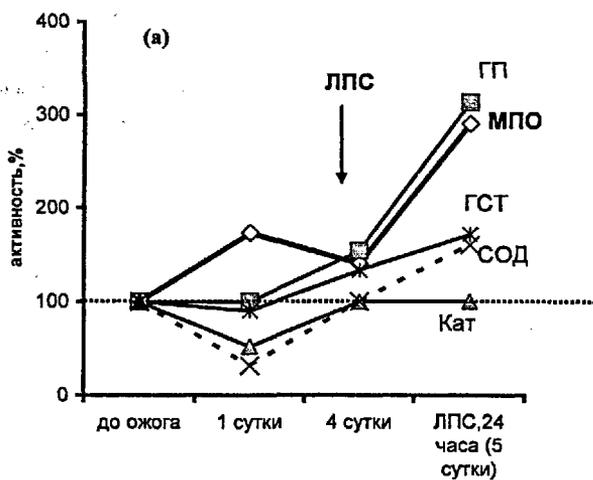


Рис. 15. Влияние бактериального липополисахарида на активность миелопероксидазы и антиоксидантных ферментов в коже крыс: (а) – после ожога; (б)- у здоровых животных. ЛПС вводили в дозе 1 мг/кг внутривенно. Образцы кожи забирали в 20 мм от зоны повреждения.

По сравнению с реакцией кожи здоровых крыс на эндотоксемию, у животных с ожогами степень изменения активности миелопероксидазы была намного выше, а глутатион-S-трансферазы и каталазы – намного ниже. По-видимому, при ожогах бактериальная эндотоксемия увеличивает миграцию нейтрофилов в кожу вблизи зоны повреждения. В то же время, в результате ожога ослабевают механизмы адаптационной активации антиоксидантных ферментов кожи – глутатион-S-трансферазы и каталазы. В итоге усиливается риск развития местного окислительного стресса.

Для сравнения степени изменения активности ферментов в ожоговой ране и в коже вне зоны повреждения проводили эксперимент с двукратным удалением струпа на 4-е и 8-е сутки после ожога. В ткани раны даже на 12-е сутки активность миелопероксидазы превышала нормальные для кожи значения. В коже вне зоны ожога активность миелопероксидазы снижалась к 4-м суткам, а затем постепенно увеличивалась к 12-м суткам. При заживлении ожоговой раны под струпом (без проведения хирургической некрэктомии) на 12-е сутки показатель был в норме (Рис.16).

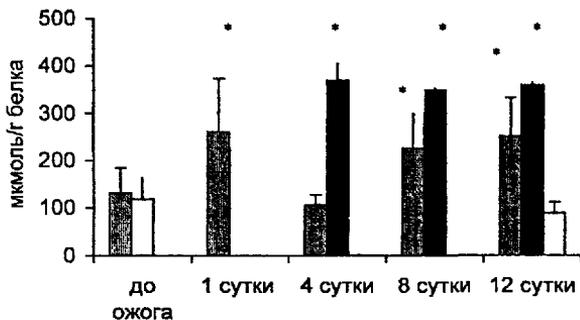


Рис. 16. Активность миелопероксидазы в образцах кожи крыс вне зоны ожога (светлые и серые столбики) и в ткани раны (темные столбики). Светлые столбики – эксперимент без удаления струпа, серые столбики – эксперимент с удалением струпа на 4-е и 8-е сутки после ожога.

*- $p < 0,05$ относительно точки «до ожога».

Активность глутатион пероксидазы в ткани раны постепенно восстанавливалась до нормальных для кожи значений, тогда как в коже вне зоны ожога наблюдалось достоверное превышение нормы уже на 4-е сутки. Повышение активности глутатион

пероксидазы в коже наблюдалось вплоть до 12-х суток независимо от проведения операций (Рис. 18-а). Аналогичные закономерности были выявлены и для глутатион-S-трансферазы. Ее активность в ткани раны падала на 8-е сутки и не превышала норму для кожи вплоть до 12-х суток, тогда как в коже на фоне двукратного проведения некрэктомии наблюдался значительный рост показателя к 12-м суткам (Рис.18-б).

Согласно этим данным, окислительный стресс в коже в результате ожога запускает механизмы, ведущие к активации антиоксидантных ферментов. Однако под действием факторов, стимулирующих дополнительный рост активности нейтрофилов (эндотоксемия, хирургическая травма) уровень местного образования АФК возрастает настолько, что происходит инактивация защитных ферментов, усиливая окислительный стресс не только в очаге повреждения, но и в коже вблизи ожога.

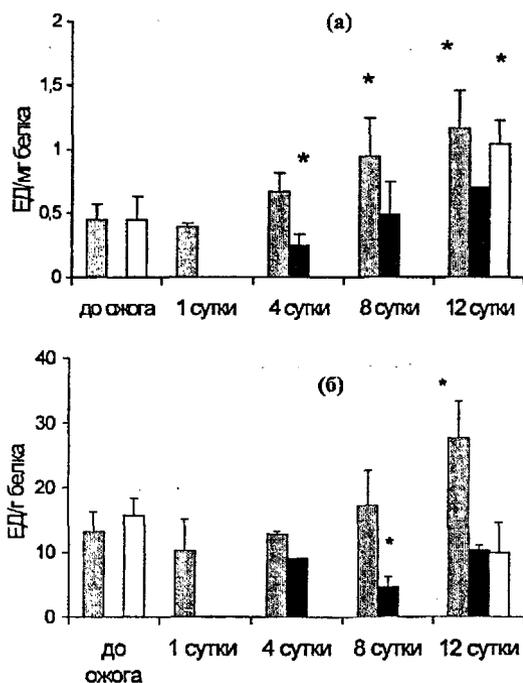


Рис. 18. Изменение активности ГП (а) и ГСТ (б) в коже крысы вне зоны ожога и в ткани раны.

Светлые столбики – кожа, эксперимент без удаления струпа; серые столбики – кожа, эксперимент с удалением струпов на 4-е и 8-е сутки; темные столбики – ткань раны.

*- $p < 0,05$ относительно точки «до ожога».

6.Эффекты экзогенных антиоксидантов при ожоговой травме. Для перорального применения был выбран комплекс антиоксидантов, включающий в себя альфа-токоферол, убихинон, метионин, селен аспартат, фосфолипиды сои. По литературным данным, каждый из этих компонентов дает положительный эффект при ожогах.

В экспериментальном исследовании ежедневное введение препарата животным позволило снизить хемилюминесцентную активность крови на пике воспаления (на 4-е сутки) (Рис. 18).

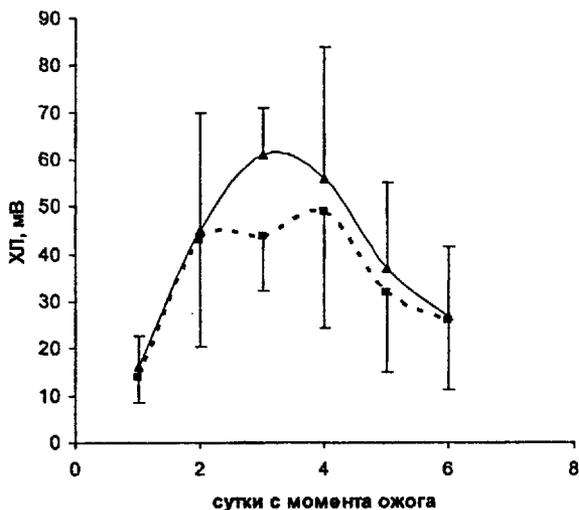


Рис. 18. Изменение хемилюминесценции (ХЛ) крови животных контрольной (▲) и опытной (■) групп. Животные опытной группы ежедневно получали комплекс антиоксидантов (140 мг/кг). Хемилюминесценцию стимулировали ФМА (0,1 мкг/мл) в присутствии люминола (0,2 мМ).

* - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

На фоне приема препарата стабилизировалась антиокислительная активность плазмы (Рис.19-а).

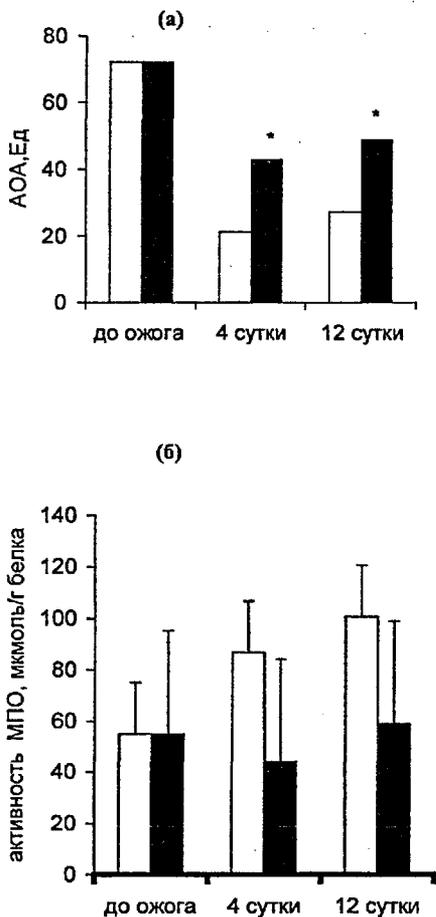


Рис. 19. Антиокислительная активность (АОА) плазмы крыс (а) и активность миелопероксидазы в ткани легких (б) до и после ожога. Контрольная группа - светлые столбики; опытная группа - темные столбики. Животные опытной группы ежедневно получали комплекс антиоксидантов (140 мг/кг). * - $p < 0,05$ относительно контрольной группы

Анализ ткани легких животных после ожога и ожога, осложненного эндотоксемией, выявил отсутствие подъема активности миелопероксидазы у животных опытной группы, получавших комплекс антиоксидантов (Рис.19-б).

Препарат не оказывал влияния на активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах при ожогах.

Анализ кожи вне зоны повреждения показал, что рост активности миелопероксидазы после ожога не зависел от приема препарата, однако под действием бактериального липополисахарида рост показателя в опытной группе (у животных, получавших препарат) был достоверно меньше, чем в контрольной группе (табл. 5)

Таблица 5. Активность миелопероксидазы в эпидермисе крыс вне зоны ожога (Ед/г белка).

Сутки после ожога	Группа животных	
	Контрольная (n=6)	Опытная (n=6)
0 (до ожога)	20,6 ± 7,8	33,1 ± 15,5
4	53,6 ± 13,4*	65,5 ± 27,9
5 (24 часа после введения ЛПС)	121,1 ± 40,9***	74,3 ± 20,7*

* - $p < 0,05$ относительно значения до ожога.

** - $p < 0,05$ относительно значения точки «4 сутки».

Комплексное воздействие препарата при ожогах заключалось, таким образом, в регуляции процессов образования радикалов в крови без полного их угнетения (что привело бы к сепсису) и в снижении риска развития осложнений (повреждения легких и кожи вблизи зоны ожога).

Данные *клинико-лабораторного исследования* получены в группе пациентов с ожогами средней тяжести, получавших комплекс антиоксидантов в виде водной суспензии ежедневно начиная с вторых-третьих суток после ожога (6 человек, площадь ожога $26,7 \pm 7,5\%$ общей поверхности тела). Группу сравнения составили 7 детей со средней площадью ожога $21,4 \pm 4,8\%$.

Применение комплекса антиоксидантов позволило снизить уровень хемиллюминесценции крови на пике воспаления (4-7 сутки после травмы) (Рис. 20-а).

Одновременно происходила нормализация антиокислительной активности плазмы: только на 8-12 сутки этот показатель был ниже нормы (Рис. 20-б).

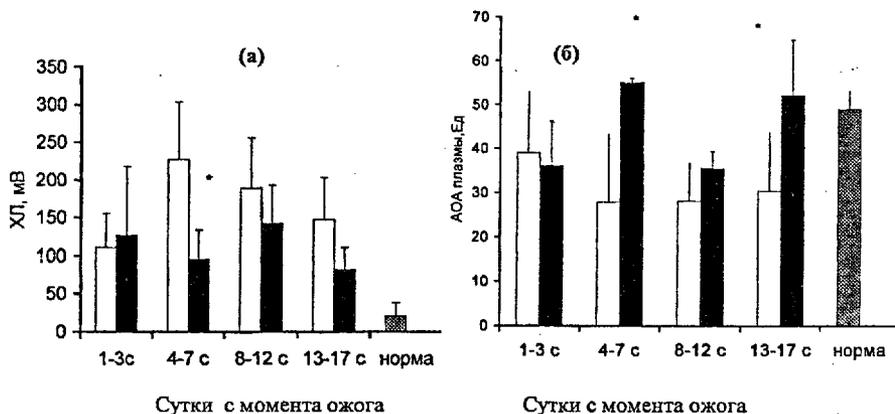


Рис. 20. Динамика изменения хемилуминесценции (ХЛ) крови (а) и АОА плазмы (б) у пациентов с ожогами средней тяжести (15-30%) на фоне приема комплекса антиоксидантов (100 мг/кг в день) (темные столбики) и в группе сравнения (светлые столбики).

* $p < 0,05$ относительно группы сравнения (без антиоксидантной терапии)

Прием препарата не влиял на сроки приживления кожных лоскутов после аутодермопластики, однако, в группе сравнения были отмечены два случая частичного лизиса пересаженного лоскута (в отличие от группы пациентов, получавших комплекс). Кроме того, на фоне приема препарата у двух пациентов на 4-5 сутки отмечалась активная красная и островковая эпителизация.

7. Эффекты местного применения фитопрепарата с антиоксидантной активностью. Выбор фитопрепарата на основе ферментированной папайи в качестве средства местной терапии при экспериментальных ожогах был обусловлен его антиоксидантными свойствами в модельных системах *in vitro* и способностью угнетать активность бактериальной каталазы. В концентрации 1-5 мг/мл препарат на 50% снижал образование супероксидного радикала в системе ксантин-ксантинооксидаза ($C_{50}=5$ мг/мл), гидроксильного радикала в реакции Фентона ($C_{50}=1$ мг/мл) и хемилуминесцентную

активность крови человека *in vitro* ($C_{50}=2$ мг/мл). Антиоксидантные свойства препарата обусловлены, по-видимому, содержанием в нем полифенолов (0,46 мкг/мг).

Предобработка штаммов бактерий с высокой активностью каталазы (*Staphylococcus aureus*) фитопрепаратом (50 мг/мл) *in vitro* уменьшала активность фермента на 35%. Каталаза является мощным фактором персистенции бактерий в фагоцитах [Харасва З.Ф., 2003], и ее ингибирование фитопрепаратом существенно (в 500 раз) увеличивало количество погибших после фагоцитоза стафилококков.

В экспериментальном исследовании фитопрепарат наносили на ожоговую рану под повязку после удаления струпа на 4-е и 8-е сутки. Образцы грануляционной ткани животных опытной и контрольной групп существенно различались по активности каталазы на 12-е сутки ($15,6\pm 5,5$ и $70,5\pm 30,2$ ЕД/мг белка соответственно; $p<0,05$). Различия между группами по активности супероксид дисмутазы отсутствовали.

Данные планиметрии свидетельствовали о существенном ускорении раназаживления у животных опытной группы (Рис. 21).

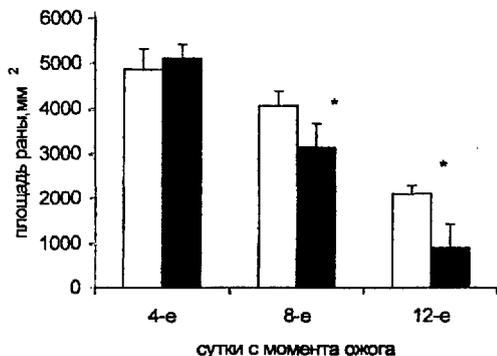


Рис. 21. Динамика заживления ожоговой раны у крыс опытной группы (темные столбики) и контрольной группы (светлые столбики).

Животным опытной группы наносили на рану фитопрепарат на 4-е и 8-е сутки после удаления струпа.

*- $p<0,05$ относительно контрольной группы

На 12-е сутки площадь раны у животных экспериментальной группы была в 2 раза меньше, чем в контрольной группе. Одновременно в опытной группе происходило более заметное снижение хемиллюминесцентной активности крови (на 12-е сутки значения показателя в опытной и контрольной группах составляли $17,5\pm 0,1$ и $33,5\pm 17,6$ мВ соответственно при норме $9,3\pm 4,0$ мВ).

Поскольку изучаемый фитопрепарат представляет собой сложный комплекс полифенолов, кислот, сахаров, полученные эффекты могут быть результатом сочетанного действия разных факторов, в первую очередь, антиоксидантов.

В целом, проведенные экспериментальные и клинико-лабораторные исследования выявили существенные сдвиги в системе антиоксидантной защиты тканей при ожогах, происходящие на фоне резкого увеличения активности нейтрофилов. Острая воспалительная реакция при ожоговой травме характеризуется резким ростом хемиллюминесцентной активности крови и изолированных нейтрофилов, сдвигом спектра образуемых АФК в сторону пероксидов, реагирующих преимущественно с люминолом. Резкое увеличение активности миелопероксидазы в тканях свидетельствует о миграции нейтрофилов из кровотока, что в сочетании с их возросшей радикал-продуцирующей активностью создает угрозу окислительного повреждения тканей. Механизм окислительного стресса в такой ситуации включает в себя опережающий рост активности миелопероксидазы по сравнению с антиоксидантными ферментами. В наиболее тяжелых ситуациях (в очаге повреждения, при эндотоксемии) активация антиоксидантных ферментов нарушена, возможно, за счет прямого подавления их избытком оксидантов. Ингибирование антиоксидантных ферментов наблюдалось также в эритроцитах при послеожоговой эндотоксемии.

Таким образом, для защиты крови, кожи и внутренних органов от окислительного стресса при тяжелой ожоговой травме необходимо системное применение антиоксидантных комплексов начиная с первых дней после ожога. Антиоксидантная терапия способствует снижению избыточной продукции оксидантов на пике воспаления, не угнетая активность нейтрофилов в целом, и защищает собственную антиоксидантную систему организма.

ВЫВОДЫ

1. Тяжелые ожоги вызывают окислительный стресс, обусловленный резким ростом активности нейтрофилов и нарушением механизмов адаптационной стимуляции антиоксидантных ферментов в эритроцитах и в коже.
2. Рост люминол-зависимой хемиллюминесцентной активности крови отражает увеличение активности нейтрофилов при ожогах. При площади глубоких ожогов 15-30% общей поверхности тела максимальный уровень хемиллюминесценции прямо пропорционален площади глубокого ожога и десятикратно превышает нормальные значения.
3. У пациентов с критическими ожогами (35-70%) общей поверхности тела наблюдается обратная зависимость между максимальным подъемом люминол-зависимой хемиллюминесценции и площадью глубокого ожога при более чем 20-ти

кратном превышении нормальных значений показателя. При этом люцигенин-зависимая хемиллюминесценция превышала норму не более, чем в 8 раз.

4. Послеожоговая эндотоксемия, обусловленная бактериальным липополисахаридом (1мг/кг), ведет к дальнейшему усилению хемиллюминесцентной активности крови (в 2 раза), росту активности миелопероксидазы в легких (в 3 раза), к снижению активности антиоксидантных ферментов эритроцитов и антиокислительной активности плазмы.
5. Хирургическое удаление ожогового струпа способно повышать хемиллюминесцентную активность крови, поэтому необходим мониторинг показателей хемиллюминесценции в период активных хирургических вмешательств.
6. Развитию некроза кожи в зоне ожога предшествует резкое увеличение активности миелопероксидазы, свидетельствующее о миграции нейтрофилов, и снижение активности антиоксидантных ферментов в поврежденной коже.
7. Выявлен подъем активности миелопероксидазы в коже крыс вне зоны ожога (в 1,5 раза в течение первых суток) и способность кожи к адаптационному повышению активности антиоксидантных ферментов, в первую очередь, глутатион пероксидазы и глутатион-S-трансферазы. При этом ожоги ослабляют адаптационную реакцию ферментов кожи (каталазы, глутатион-S-трансферазы) на бактериальный липополисахарид.
8. Системное применение комплекса антиоксидантов при ожогах позволяет уменьшить хемиллюминесцентную активность крови на пике воспаления, инфильтрацию ткани легких нейтрофилами (в том числе, и при послеожоговой эндотоксемии) и нормализовать антиокислительную активность плазмы.
9. Местное применение антиоксидантного фитопрепарата на основе ферментированной папайи ускоряет заживление ожоговых ран.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

АОА – антиокислительная активность
АФК – активные формы кислорода
ГП – глутатион пероксидаза
ГСТ – глутатион-S-трансфераза
ЖСС – железо-связывающая способность
Кат – каталаза
МДА –малоновый диальдегид

МПО – миелопероксидаза
ОПТ – общая поверхность тела
ПМЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты
ПОН – полиорганная недостаточность
ФМА – форболмиригатацетат
ХЛ - хемиллюминесценция

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Михальчик Е.В., Коркина Л.Г., Шиян С.Д., Бовин Н.В. Влияние неогликоконъюгатов на люминольную хемлюминесценцию перитонеальных макрофагов крыс *in vitro*// Биологические мембраны.-1994.- Т.11, №6.- С.581-587.
2. Михальчик Е.В., Харасва З.Ф., Ковальчук Л.В., Коркина Л.Г. Влияние интерлейкина-2 и интерферона-гамма на «дыхательный взрыв» макрофагов: изменения внутриклеточной продукции радикалов и углеводспецифических взаимодействий// Биологические мембраны.- 1996.- Т.13, №14. - С.361-366.
3. Харасва З.Ф., Михальчик Е.В., Коркина Л.Г., Ковальчук Л.В. Влияние рекомбинантных иммуноцитоклинов на фагоцитоз и внутриклеточный киллинг нейтрофилами штаммов *Staphylococcus aureus* с различной каталазной активностью// Вестник Кабардино-Балакарского государственного университета. Серия «Медицинские науки».-2001.- №4.- С.11-15.
4. Михальчик Е.В., Хараева З.Ф., Супрун М.В., Коркина Л.Г. Свободные радикалы в патогенезе стафилококковых инфекций; Смоленск, 2001 г.: Материалы научно-практической конференции «Свободные радикалы, антиоксиданты и болезни человека». – Смоленск,2001.- С.72-73.
5. Михальчик Е.В., Хараева З.Ф., Балабушевич Н.Г., Коркина Л.Г. Антикаталазный эффект препаратов на основе тропических растений – новый подход к борьбе с патогенными микроорганизмами; Смоленск, 2001 г.: Материалы научно-практической конференции «Свободные радикалы, антиоксиданты и болезни человека». – Смоленск,2001.- С.337-339.
6. Mikhal'chik E.V., Kharaeva Z.F., Koval'chuk L.V., Nagoev B.S., Korkina L.G. The influence of cytokines upon the free-radical status of blood of patients with generalized and local Staphylococcal infection// R.J.Immunol.- 2002.- V.7, N 3.- P.251-258.
7. Mikhal'chik E.V., Kharaeva Z.F., Oparin R.B., Korkina L.G. Relevance of the papaya fermentation product in the treatment of local inflammation and allergodermatoses associated with secondary infections; St.Petersburg-Kiszhi, July 2002.: Thes. Int. Symp. "Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Diagnostic, Preventive and Therapeutic Values".- St.Petersburg-Kiszhi, 2002.-P. 1-32.
8. Korkina L.G., Kharaeva Z.F., Mikhal'chik E.V., Feliccia D., Luci A. Experimental basis for beneficial effects of pro-antioxidants in treatment of viral and bacterial skin lesion; Geneva, September 2002.: Thes. the 32-nd Annual Meeting "Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Diagnostic and Therapeutic Values".-Geneva, 2002.- P.313.

9. Suprun M.V., Mikhal'chik E.V., Afanasiev I.B., Korkina L.G. Inhibitory effect of natural product from *Carica Papaya* on production of oxygen and nitrogen radicals in cell free and cellular systems. ESR and chemiluminescence study; Novosibirsk, July 2002.: Thes. the VI Voevodsky Conference "Physics and Chemistry of elementary chemical processes".- Novosibirsk, 2002.- P.96.
10. Лючи А., Деева И., Михальчик Е., Трахтман И., Де Люка К., Коркина Л. Успешное лечение рецидивирующих бородавок комбинацией криохирургии и перорального витаминно-аминокислотного препарата, содержащего коэнзим Q// Вестник Эстет. Мед.-2003.-Т.2, №3.- С.136-140.
11. De Luca C., Kharaeva Z., Mikhal'chik E., Luci A., Korkina L. Efficacia di una formulazione a base di pro/antioossidanti nel trattamento delle infezioni batteriche cutanee; Capri, Ottobre 2003.: Thes. Associazione Dermatologi Ospedalieri Italiani, XLI Congresso Nazionale.- Capri, 2003.- P.117.
12. Mikhal'chik E., Pen'kov L., De Luca C., Korkina L. I radicali liberi come mediatori della sindrome multi-organo nelle grandi ustioni in eta pediatrica; Roma, Apr., 2003.: Mat.1 Congresso Nazionale Societa Italiana Dermatologia Pediatrica (Si DerP), Roma, 2003- P.1-3.
13. Korkina L.G., Suprun M.V., Mikhal'chik E.V., Petrova A.V., Luci A., De Luca C. The protective and healing effects of a natural antioxidant formulation based on ubiquinol and Aloe vera against dextran sulfate-induced ulcerative colitis in rats// BioFactors.- 2003.- V.18, N 1-4.- P.255-264.
14. Михальчик Е.В., Ануров М.В., Титкова С.М., Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И., Коркина Л.Г. Эффекты биологически активной добавки «Инсол» с антипротеазной активностью в модели острого воспаления// Вестник РГМУ.- 2004.- Т.38, №7.- С.71-74.
15. Михальчик Е.В., Иванова А.В., Ануров М.В., Титкова С.М., Пеньков Л.Ю., Коркина Л.Г. Профилактическое и лечебное действие комплексного антиоксидантного препарата при ожоговой травме у крыс// Бюлл.эксперим.биол.мед.- 2004.- Т.138, №9.- С.299-301.
16. Михальчик Е.В., Иванова А.В., Ануров М.В., Титкова С.М., Пеньков Л.Ю., Хараева З.Ф., Коркина Л.Г. Ранозаживляющее действие препарата на основе папайи в экспериментальной модели термической травмы// Бюлл.эксперим. биол. мед. – 2004.- Т.137, №6.- С.638-640.

17. Mikhail'chik E., Markushina M., Pen'kov L., Budkevich L., Korkina L. Free radicals as mediators of multi-organ failure after major pediatric burns; Gdansk, May 2005.: Thes. Of the Sixth European Paediatric Surgical Congress.- Gdansk, Poland, 2005.- P.106.
18. Mikhail'chik E.V., Titkova S.M., Anurov M.V., Oettinger A.P., Korkina L.G. The effect of burn trauma in rats on neutrophil recruitment and antioxidant enzymes activity in epidermis// Clin. Immunol.- 2005.-V.116, N 3.- S.255.
19. 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 Эстет. Мед.- 2005.- №4.- С.14-20.
20. Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И., Михальчик Е.В., Ануров М.В., Титкова С.М., Коркина Л.Г. Эффекты биологической добавки «Инсол» с антипротеиназной активностью в модели острого воспаления; Москва, апрель 2005 г.: Тез.докл. XII Российского национального конгресса «Человек и лекарство».- Москва, 2005.- С.638.
21. Макаров П.В., Титкова С.М., Ануров М.В., Михальчик Е.В., Чеснокова Н.Б., Безнов О.В., Столярова Е.Н., Оганесян О.Г., Трофимова М.В., Акопян А.В., Ключиков В.Ю., Коркина Л.Г. Изучение состояния местной антиоксидантной системы глаза при экспериментальной ожоговой травме роговицы и перспективы фармакологической коррекции ее показателей// Вестник офтальмологии. - 2005.- №6. - С.40-43.
22. Mikhail'chik E.V., Titkova S.M., Anurov M.V., Korkina L.G. Pro- and antioxidant enzymes in skin after experimental burns; Moscow-St.Petersburg, June 2005.: Thes. of the 1st Int.Conference "Skin & Environment".- Moscow-St.Petersburg, 2005.- P.22.
23. Mikhail'chik E.V., Ivanova A.V., Titkova S.M., Anurov M.V., Korkina L.G. The effect of E.coli lipopolysaccharide on oxidative and antioxidant enzymes in epidermis of rats after severe burns; Moscow-St.Petersburg, June 2005.: Thes.of the 1st Int.Conference "Skin & Environment".- Moscow-St.Petersburg, 2005.- P.70.
24. Miroshnikova E.A., 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; Moscow-St.Petersburg, June 2005.: Thes. of the 1st Int.Conference "Skin & Environment".- Moscow-St.Petersburg, 2005.- P.72.
- ✓ 25. Михальчик Е.В., Пеньков Л.Ю., Будкевич Л.И., Маркушина М.С., Иванова А.В., Коркина Л.Г. Маркеры окислительного стресса при хирургическом лечении детей с ожоговой травмой// Детская хирургия.- 2005.- №3.- С.40-44.
- ✓ 26. Михальчик Е.В., Титкова С.М., Ануров М.В., Эттингер А.П., Коркина Л.Г. Защитное действие комплексного антиоксидантного препарата на основе витаминов и

аминокислот при ожоговой травме у крыс, осложненной эндотоксемией//
Бюлл.эксперим. биол. мед.-2006.-Т.141, №6.- С.636-638.

- ✓ 27. Иванова А.В., Михальчик Е.В., Мирошникова Е.А., Лукашева Е.В., Коркина Л.Г. Влияние эндотоксемии на антиоксидантные ферменты кожи крыс//
Бюлл.эксперим.биол.мед.-2006.-т.142, № 10.-С.393-395.
28. Мирошникова Е.А., Михальчик Е.В., Лукашева Е.В., Мухамед Ф., Неробеев А. Особенности воспалительной реакции при пластических операциях на лице//
Эстетическая медицина.-2006.-Т.5, №2.-С.136-140.
29. Korkina L., Mikhal'chik E., Suprun M., Pastore S., Pressi G., Dal Toso R. Anti-inflammatory and wound healing activity of verbascosides derived from cultured plant cells// *J.Investigative Dermatology*.-2006.-V.125, N 3.- P.50.
30. De Luca C., Mikhal'chik E., Korkina L. Free radicals as mediators of multi-organ failure after major burns// *J.Investigative Dermatology*.-2006.-V.125, N 3.- P.48.
31. Михальчик Е.В., Ануров М.В., Титкова С.М., Мирошникова Е.А., Лукашева Е.В., Ибрагимова Г.А., Коркина Л.Г. Активность антиоксидантных ферментов кожи при хирургических ранах// Бюлл.эксперим.биол.мед. -2006.-т.146, №11.
32. Михальчик Е.В., Титкова С.М., Ануров М.В., Пеньков Л.Ю., Коркина Л.Г. Антиоксидантные ферменты кожи при экспериментальных ожогах// Биомедицинская химия.-2006.-Т.52, № 6.

Михальчик Е.В. (Россия). «Показатели окислительного стресса при ожоговой травме».

Диссертационная работа посвящена исследованию активности нейтрофилов и системы антиоксидантной защиты крови и кожи на разных стадиях воспалительного процесса, вызванного ожоговой травмой. Было показано, что у детей с ожогами люминол-зависимая хемилюминесценция цельной крови отражает степень активации нейтрофилов и зависит от площади глубокого ожога, сроков с момента травмы, тяжести органических повреждений и проведения хирургических операций по удалению струпа. В эксперименте было показано, что у крыс ожоги (20% ОПТ) и послеожоговая эндотоксемия вызывают миграцию нейтрофилов в поврежденную кожу и в легкие. В сочетании с развитием дисбаланса в системе антиоксидантной защиты крови и кожи активированные нейтрофилы создают угрозу окислительного повреждения тканей. Было показано, что адаптационные изменения кожи вблизи зоны повреждения связаны с ростом активности глутатион-пероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Системное применение комплекса антиоксидантов на основе альфа-токоферола, убихинона, селен-аспартата позволило снизить хемилюминесцентную активность крови на пике воспаления и предотвратить миграцию нейтрофилов в ткань легких, а местное применение антиоксидантного фитопрепарата ускорило заживление ожоговой раны. Полученные результаты могут быть использованы для усовершенствования диагностики состояния пациентов с ожоговой болезнью, разработки тактики антиоксидантной терапии и предотвращения системных (полиорганная недостаточность) и местных (вторичный некроз) осложнений при ожогах.

Mikhal'chik E.V. (Russia). "The parameters of oxidative stress after severe burns"

The thesis is devoted to the study of oxidative stress in blood and skin resulting from acute inflammation launched by severe burns. The chemiluminescence of whole blood was assessed in clinic and in experimental model of thermal trauma in rats. The values of chemiluminescence were dependent on the deep burn area, the period from the day of trauma, endotoxemia, surgical necrectomy. Burn trauma and post-burn endotoxemia were followed by neutrophils migration into lung tissue and skin (into burned area and its vicinity), registered as growth of tissue myeloperoxidase activity. The antioxidant enzymes activity went down in the burned area and steadily grew up in skin close to it. The treatment with antioxidant formulation based on alpha-tocopherol, selenium-aspartat, ubiquinol, methionin, soybean phospholipids had normalizing effect on the peak chemiluminescence values, antioxidant activity of plasma and myeloperoxidase activity in lung. Treatment of the burn wounds with syrup of fermented papaya showing antioxidant activity in model systems accelerated wound healing. These results may be useful for diagnostics and treatment of patients with severe burns.

**Заказ №417. Объем 2 п.л. Тираж 100 экз.
Отпечатано в ООО «Петрорун».
г. Москва, ул. Палиха-2а, тел. 250-92-06
www.postator.ru**