

УДК: 541.49; 615.015:615.05; 616.24; 616-0.01.17.0.01.08

А.О. Очеретнюк, А.В. Мельник**МАРКЕРИ ЗАПАЛЕННЯ, ЕНДОГЕННІ ІНТОКСИКАЦІЇ, ОКСИДАТИВНО-ГО СТРЕСУ ТА СТАН ПРО-АНТИОКСИДАНТНИХ СИСТЕМ У ЩУРІВ З ОПІКОВОЮ ТРАВМОЮ ШКІРИ І НА ТЛІ ДІЇ ІНФУЗІЙНИХ РОЗЧИНІВ ЛАКТОПРОТЕЇНУ З СОРБИТОЛОМ ТА НАЕС-LX-5%***Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова*

Очеретнюк А.О., Мельник А.В. Маркери запалення, ендогенної інтоксикації, оксидативного стресу та стан про-антиоксидантних систем у щурів з опіковою травмою шкіри і на тлі дії інфузійних розчинів лактопротеїну з сорбітолом та НАЕС-LX-5% // Український медичний альманах. – 2014. – Том 17, № 3. – С. 65-68.

В роботі показано, що за умов опікової хвороби, особливо на 3 добу, розвивається оксидативний стрес, дисбаланс в системі про-антиоксидантів, зростає вміст маркерів ендогенної інтоксикації та запалення. Введення колоїдно-гіперосмолярного розчину - НАЕС-LX-5% та розчину лактопротеїну з сорбітолом щурам з опіковою травмою шкіри приблизно в однаковій мірі справляє протизапальну, антиоксидантну дію, зменшує дисбаланс в про-антиоксидантній системі та виразність ендогенної інтоксикації, при чому їх протекторна дія найбільш виразна на 7 добу експерименту.

Ключові слова: інфузійна терапія, оксидативний стрес, про-антиоксидантні системи, маркери запалення та ендогенної інтоксикації, НАЕС-LX-5%, лактопротеїн з сорбітолом.

Очеретнюк А.О., Мельник А.В. Маркеры воспаления, эндогенной интоксикации, оксидативного стресса и состояние про- антиоксидантных систем у крыс с ожоговой травмой кожи и на фоне действия инфузионных растворов лактопротеина с сорбитолом и НАЕС- LX-5 % // Украинский медицинский альманах. – 2014. – Том 17, № 3. – С. 65-68.

В работе показано, что при ожоговой болезни, особенно на 3 сутки, развивается оксидативный стресс, дисбаланс в системе про- антиоксидантов, возрастает содержание маркеров эндогенной интоксикации и воспаления. Введение крысам с ожоговой травмой кожи коллоидно-гиперосмолярного раствора - НАЕС-LX -5 % и раствора лактопротеина с сорбитолом примерно в равной степени оказывает противовоспалительное, антиоксидантное действие, уменьшают дисбаланс в про-антиоксидантной системе и выраженность эндогенной интоксикации, причем их протекторное действие максимально на 7 сутки эксперимента.

Ключевые слова: инфузионная терапия, оксидативный стресс, про- антиоксидантные системы, маркеры воспаления и эндогенной интоксикации, НАЕС- LX -5 %, лактопротеин с сорбитолом.

Ocheretnyuk A.O., Melnik A.V. Inflammatory, endogenous intoxication, oxidative stress markers and condition – of pro-antioxidant system in rats with skin burns that undergo infusion of lactoprotein solution with sorbitol and НАЕС-LX- 5% // Украинский медицинский альманах. – 2014. – Том 17, № 3. – С. 65-68.

It is shown that in a case of burn disease, especially on day 3, oxidative stress takes place, an imbalance in antioxidant system, increases the content of endogenous intoxication and inflammation markers. Infusion of colloidal hyperosmolar solution - НАЕС-LX- 5% and lactoprotein solution with sorbitol equally causes anti-inflammatory, antioxidant effect, reduces the imbalance in pro- and antioxidant system and severity of endogenous intoxication in rats with skin burns. Their protective effect is the most expressive on day 7 of the experiment.

Key words: infusion therapy, oxidative stress, pro-antioxidant system, markers of inflammation and endogenous intoxication, НАЕС-LX- 5%, lactoprotein with sorbitol.

Вступ. Проблема опікової травми залишається однією із актуальних в сучасній медицині. Опіки є поширеним видом побутової і виробничої травми, яка має тенденцію до зростання. Незважаючи на інтенсивні дослідження патогенезу опікової хвороби, досі залишаються нез'ясованими молекулярні механізми формування змін в організмі у різні періоди розвитку опікової хвороби [7]. Однією із найважливіх стадій опікової хвороби вважається опіковий шок [8], який є причиною загибелі до 25% постраждалих з важкими опіками на 1-4 добу після опікової травми. Висока летальність в гострому періоді опікової хвороби обумовлена порушенням центральної гемодинаміки, формуванням мікроциркуляторних розладів внаслідок первинної гіповолемії, стрес-реакції, масового вивільнення цитокінів, розвитку оксидативного стресу та ендогенної інтоксикації.

Серед пропозицій фармакотерапії ранніх

проявів опікової травми пропонується використання комплексних інфузійних розчинів, серед яких слід виділити фізіологічний розчин натрію хлориду, розчин лактопротеїну з сорбітолом та препарат, який проходить доклінічні дослідження - НАЕС-LX-5% [3]. Для з'ясування ефективності препарату НАЕС-LX-5% доцільно проаналізувати його вплив на різні молекулярні та патофізіологічні механізми розвитку опікової хвороби, порівняно з референт-препаратом – лактопротеїном.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Стаття виконувалась відповідно до основного плану науководослідних робіт Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова і є фрагментом теми «Структурні зміни в легенях в умовах ендогенної інтоксикації, що викликана опіком шкіри, та її корекції вітчизняними інфузійними препаратами лактопротеїну».

ном з сорбітолом та HAES-LX-5% (експериментальне дослідження)», № держреєстрації 0112U004187.

Метою дослідження було оцінити вплив інфузійних розчинів HAES-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом на маркери запалення, ендогенної інтоксикації, оксидативного стресу та стан про-антиоксидантних систем у щурів з опіковою травмою шкіри.

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження виконані на 32 білих нелінійних щурах-самцях масою 160-180 г., які було отримано із віварію Інституту фармакології та токсикології АМН України. Дослідження проводили в лабораторії кафедри фармакології ВНМУ, сертифікованої ДФЦ МОЗУ (посвідчення №000679 від 11.01.2008р.). Тварини були розподілені на групи по 8 щурів у кожній: I – щурі, яким проводили катетеризацію стегнової вени без опіку (тварини без опіку); II – щурі з опіком та встановленим катетером у стегновій вені, яким проводилась внутрішньовенна інфузія 0,9 % розчином NaCl протягом 5-6 хв у дозі 10 мл/кг. Опіковий шок викликали шляхом прикладання 4-ох мідних пластинок (по дві пластинки з кожного боку), які попередньо тримали протягом 6 хв. у воді з постійною температурою 100°C. Загальна площа опіку у щурів зазначеної маси складає 21-23 % при експозиції 10 с, що є достатнім для формування опіку III ступеня та розвитку шокового стану середнього ступеня важкості [10]; III – щурі з опіком та встановленим катетером у стегновій вені, яким проводилась внутрішньовенна інфузія розчином лактопротеїну з сорбітолом протягом 5-6 хв у дозі 10 мл/кг/добу або IV – розчином HAES-LX-5% у тій же дозі у нижню порожнисту вену. Введення інфузійних розчинів здійснювали через 1 год після моделювання патологічного стану, а потім 1 раз на добу протягом 7 діб. Катетеризацію магістральних судин здійснювали в умовах пропофолового наркозу (60 мг/кг в/в). Тварин виводили із дослідження (на 1, 3 та 7 добу експерименту) шляхом декапітації в результаті передозування ефіру.

Біохімічні дослідження виконані в науково-дослідній клініко-діагностичній лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво про переатестацію №002/10 від 11 січня 2010 р.). Сироватку крові виділяли за стандартною методикою [6]. Гомогенати легень отримували після відокремлення крупних бронхів та трахеї, тканини гомогенізували в скляному гомогенізаторі з тefлоновим пестиком при 3000 об/хв 5 хвилин в 0,154 М розчині хлориду калію у ваговому співвідношенні 1:3, центрифугували при 600 g протягом 30 хвилин, супернатанат використовували для біохімічних досліджень.

В сироватці крові визначали вміст маркерів запального процесу та ендотоксикозу (С-реактивного білка, середніх молекул), окис-

нювального пошкодження білків та ліпідів (малонового діальдегіду, карбонільних груп білків). В гомогенаті легень визначали активність прооксидантного ферменту НАДФН-оксидази (КФ 1.6.3.1) та антиоксидантного ферменту – супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1), рівень малонового діальдегіду та карбонільних груп білків.

Вміст середньомолекулярних олігопептидів (середніх молекул) визначали спектрофотометричним методом при довжині хвиль УФ-опромінування 220 нм [2]. Вміст С-реактивного білка визначали імуноферментним методом за набором «Rat C-Reactive Protein [CRP] ELISA Kit» (BD Biosciences, США). Активність супероксиддисмутази визначали за інгібуванням окиснення кверцетину [4]. Активність НАДФН-оксидази (КФ 1.6.3.1) визначали за падінням поглинання НАДФН при 340 нм [11]. Вміст білка в гомогенатах легень визначали мікробиуретовим методом [5]. Вміст малонового діальдегіду визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [1], а білкових карбонільних груп - за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [9].

Отримані результати та їх обговорення. Опікова травма шкіри супроводжується розвитком оксидативного стресу (табл. 1) в організмі щурів, ураженням білкових та ліпідних структур клітинних мембран, що особливо виражено на 3 добу хвороби. Так, в контрольній групі тварин на 1 добу експерименту реєструється достовірне зростання вмісту малонового діальдегіду (на 87,0% в сироватці крові та на 96,0% в легенях) і карбонільних груп протеїнів (на 60,2% в сироватці крові та на 88,7% в легенях), порівняно з тваринами без опіку. На 3 добу експерименту відмічається достовірне зростання вказаних показників, порівняно з такими на 1 добу експерименту. В той же час на 7 добу опікової хвороби спостерігається вірогідне зменшення вмісту маркерів ліпопероксидації та окисної деструкції білків, відносно показників на 3 добу.

Застосування інфузійних розчинів HAES-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом зменшує виразність оксидативного пошкодження білків та ліпідів, індукованого опіковою хворобою, особливо за умов їх використання протягом 7 діб (див. табл. 1). Слід зауважити, що за ефективністю антиоксидантної дії препарат HAES-LX-5% не поступався такій у лактопротеїну з сорбітолом. Інфузія розчину HAES-LX-5% супроводжується вірогідним зменшенням вмісту малонового діальдегіду (на 12,0% - 1 доба; на 31-32% - 3 доба; на 38-42% - 7 доба) та карбонільних груп (на 11-13% - 1 доба; на 26-31% - 3 доба; на 30-38% - 7 доба) в сироватці крові й постядерному супернатанті гомогенату легень, порівняно з контрольною групою. Подібна тенденція відмічалась і за умов застосування інфузійного розчину лактопротеїну з сорбітолом.

Таблиця 1. Вміст маркерів ліпопероксидації та окисної модифікації білків в сироватці крові та постядерному супернатанті легень щурів з опіковою травмою шкіри і на тлі фармакотерапії (M±m, n=8)

| Характеристика груп тварин | | Малоновий діальдегід | | Карбонільні групи протеїнів | |
|------------------------------------|--------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| | | Сироватка крові (мкмоль/л) | Легені (нмоль/мг протеїна) | Сироватка крові (нмоль/мг протеїна) | Легені (нмоль/мг протеїна) |
| Тварини без опіку | | 8,43±0,75 | 8,23±0,22 | 0,710±0,064 | 1,65±0,05 |
| Опікова травма+0,9%NaCl (контроль) | 1 доба | 15,8±0,70* | 16,1±0,27* | 1,14±0,09* | 3,12±0,04* |
| | 3 доба | 19,0±0,45*° | 21,2±0,66*° | 1,53±0,08*° | 4,02±0,21*° |
| | 7 доба | 16,4±0,42*#& | 19,0±0,50*#& | 1,30±0,06*#& | 3,48±0,12*#& |
| Опікова травма+HAES | 1 доба | 13,8±0,58*# | 14,2±0,58*# | 1,01±0,08*# | 2,70±0,08*# |
| | 3 доба | 13,2±0,64*# | 14,3±0,57*# | 1,14±0,07*# | 2,80±0,13*# |
| | 7 доба | 10,2±0,36*#& | 11,0±0,44*#& | 0,904±0,045*#& | 2,16±0,17*#& |
| Опікова травма+Лактопротеїн | 1 доба | 14,6±0,56* | 14,3±0,52* | 1,04±0,09* | 2,72±0,75* |
| | 3 доба | 13,0±0,57*#° | 15,2±0,60*# | 1,16±0,06*# | 2,82±0,75*# |
| | 7 доба | 10,4±0,20*#& | 11,9±0,53*#& | 0,970±0,046*#& | 2,28±0,15*#& |

Примітки. тут і в подальшому: 1. * - p<0,05 відносно показників у інтактних тварин; 2. # - p<0,05 відносно показників у контрольної групи; 3. ° - p<0,05 між показниками на 1 та 3 добу експерименту в межах однієї групи; 4. & - p<0,05 між показниками на 3 та 7 добу експерименту в межах однієї групи.

З'ясувалось, що розвиток оксидативного стресу за умов опікової хвороби є наслідком дисбалансу в системі про-антиоксидантних ензимів (табл. 2). У щурів контрольної групи реєструється достовірне зростання активності про-оксидантного ензиму НАДФН-оксидази (на 76,2% - 1 доба; на 110% - 3 доба; на 87,2% - 7 доба) та вірогідне зниження активності антиок-

сидантного ензиму супероксиддисмутази (на 36,2% - 1 доба; на 52,8% - 3 доба; на 43,5% - 7 доба) в постядерному супернатанті гомогенату легень. Ймовірно дисрегуляція ензимів синтезу та утилізації активних кисневих радикалів є однією із можливих причин формування оксидативного стресу на тлі опікової хвороби.

Таблиця 2. Вміст про-антиоксидантних ензимів в постядерному супернатанті гомогенату легень у щурів з опіковою травмою шкіри і на тлі фармакотерапії (M±m, n=8)

| Характеристика груп тварин | | НАДФН-оксидаза, нмоль/хв на 1мг білку | Супероксиддисмутаза, % гальмування/мг протеїну |
|------------------------------------|--------|---------------------------------------|--|
| Тварини без опіку | | 2,14±0,08 | 58,4±1,57 |
| Опікова травма+0,9%NaCl (контроль) | 1 доба | 3,76±0,18* | 37,2±2,34* |
| | 3 доба | 4,49±0,16*° | 27,6±1,75*° |
| | 7 доба | 4,00±0,15*#& | 33,0±1,50*#& |
| Опікова травма+HAES | 1 доба | 3,46±0,14*# | 42,1±2,21*# |
| | 3 доба | 3,37±0,20*# | 37,3±2,70*# |
| | 7 доба | 2,56±0,11*#& | 46,7±2,09*#& |
| Опікова травма+Лактопротеїн | 1 доба | 3,47±0,11* | 41,6±2,28* |
| | 3 доба | 3,49±0,18*# | 36,4±2,45*# |
| | 7 доба | 2,76±0,11*#& | 44,7±1,90*#& |

Введення колоїдно-гіперосмолярного розчину - HAES-LX-5% та розчину лактопротеїну з сорбітолом щурам з опіковою травмою до певної міри зменшує дисбаланс в системі про-антиоксидантних ензимів (див. табл. 2). За умов введення щурам з опіковою хворобою розчину HAES-LX-5% відмічається статистично вірогідне зниження активності НАДФН-оксидази (на 24,8% - 3 доба; на 35,8% - 7 доба) та підвищення активності супероксиддисмутази (на 35,3% - 3 доба; на 41,5% - 7 доба), порівняно з контролем. Застосування лактопротеїну з сорбітолом не поступається HAES-LX-5% за впливом на про-антиоксидантні ензими: зниження активності НАДФН-оксидази становить 22,2% на 3 добу та 31,0% на 7 добу; підвищення активності супероксиддисмутази - 32,0% на 3 добу та 35,5% на 7 добу, порівняно з контролем.

Показано, що опікова травма шкіри супро-

воджується розвитком запалення та ендогенної інтоксикації (табл. 3). Так, на 1 добу експерименту відмічається зростання вмісту молекул середньої маси та С-реактивного протеїну відповідно на 75,2 та 60,8%, на 3 добу - на 159 та 104%, а на 7 добу - на 128 та 80,3%, порівно з тваринами без опіку.

Інфузія розчинами HAES-LX-5% та лактопротеїном з сорбітолом приблизно в однаковій мірі виявляє протизапальну дію та зменшує прояви ендогенної інтоксикації, особливо за умов їх введення протягом 7 діб. Так, наприклад, під час застосування HAES-LX-5% протягом 7 діб відмічається зменшення рівня молекул середньої маси та С-реактивного протеїну відповідно на 42,5 та 35,0%, відносно контрольної групи.

Таким чином, опікова травма шкіри у щурів супроводжується дисбалансом в системі про-антиоксидантних ензимів, розвитком оксидати-

вного стресу, ураженням ліпідних та білкових структур клітин, формуванням ендогенної інтоксикації та запальних реакцій в організмі щурів. В той же час застосування інфузійних розчинів НАЕС-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом

приблизно в однаковій мірі виявляють антиоксидантну, протизапальну дію, знижують рівень ендогенної інтоксикації та зменшують дисбаланс про- та антиоксидантних систем.

Таблиця 3. Вміст маркерів запалення та ендогенної інтоксикації в сироватці крові щурів з опіковою травмою шкіри і на тлі фармакотерапії (M±m, n=8)

| Характеристика груп тварин | Молекули середньої маси, од.опт.щ | C-реактивний протеїн, мг/л |
|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| Тварини без опіку | 0,131±0,009 | 6,79±0,50 |
| Опікова травма+0,9%NaCl (контроль) | 1 доба | 0,230±0,023* |
| | 3 доба | 0,340±0,009*° |
| | 7 доба | 0,299±0,012*& |
| Опікова травма+НАЕС | 1 доба | 0,196±0,015*# |
| | 3 доба | 0,217±0,007*# |
| | 7 доба | 0,172±0,009*#& |
| Опікова травма+Лактопротеїн | 1 доба | 0,203±0,015* |
| | 3 доба | 0,228±0,008*# |
| | 7 доба | 0,183±0,006*#& |

Висновки:

1. Опікова травма шкіри у щурів супроводжується посиленням ліпопероксидації та окисної модифікації білків, зменшенням активності антиоксидантного ензиму супероксиддисмутази та зростанням активності прооксидантного ензиму НАДФН-оксидази, збільшенням рівня маркерів ендогенної інтоксикації (молекул середньої маси) та запалення (C-реактивного протеїну).

2. Застосування колоїдно-осмотичного розчину НАЕС-LX-5% та лактопротеїну з сорбітолом приблизно в однаковій мірі зменшують виразність оксидативного стресу, дисбалансу в про-антиоксидантних ензимах, ендогенної інтоксикації та запалення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. **Владимиров Ю.В.** Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.В. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
 2. **Габриэлян Н.И.** Опыт использования показателей средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей / Н.И. Габриэлян, В.И. Липатова // Лабораторное дело. – 1984. – № 3. – С. 138-140.
 3. Ефективність застосування препарату лактопротеїну з сорбітолом для профілактики порушень гомеостазу хворих з глибокими та поширеними опіками / **Г.П. Козинець, О.І. Осадча, Г.М. Боярська [та ін.]** //Сучасні досягнення інфузійної терапії: І міжнар. конгр., 2-3 жовт. 2008 р.: тези доп. – Черкаси, 2008. – 180 с.
 4. **Костюк В.А.** Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // Вопр. мед. химии. – 1990. – № 2. – С. 88-91.
 5. **Кочетов Г.А.** Практическое руководство по энзимологии / Г.А. Кочетов. – М.: Высш. шк., 1980. – 272 с.
 6. **Меньшиков В.В.** Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
 7. Механизм адаптационного ответа организма на ожоговый стресс и роль перфторана в их нормализации / **В.В. Слинченков, Е.Н. Клигуненко,**

Д.П. Лещев, Э.В. Сотникова // Актуальные проблемы термической травмы. Сб. научных тр. – Санкт-Петербург, 2002. – С. 215-217.
 8. Ожоговый шок: оптимизация интенсивной терапии / **В.К. Гусак, В.П. Шано, Ю.В. Заяц [и др.]** //Український державний НДІ реабілітації інвалідів МОЗ України. – № 2002107890; заявл. 04.10.2002; опубл. 15.07.2003; Бюл. № 7. – 2 с.
 9. Пат. України на винахід №58110А, МПК 7 А61К35/16. Спосіб визначення карбонільних сполук в сироватці крові / **С.В. Шевчук, О.О. Пентюк, Р.А. Мусін, Н.В. Заїчко**; заявник та патентовласник Український державний НДІ реабілітації інвалідів МОЗ України. – № 2002107890; заявл. 04.10.2002; опубл. 15.07.2003; Бюл. № 7. – 2 с.
 10. **Gunas I.** Method of thermal burn trauma correction by means of cryoinfluence / I. Gunas, I. Dovgan, O. Masur // Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft. 92. In Olsztyn vom 24. Bis 27. Mai 1997: bipartitemeeting / zusammen mit der Polish Anatomical Society with the participation of the Association des Anatomistes. – 1997. – P. 105.
 11. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats / **T. Fukui, N. Ishizaka, S. Rajagopalan [et al.]** // Circ. Res. – 1997. – Vol. 80, №1. – P.45-51.

Надійшла 16.03.2014 р.
 Рецензент: проф. Ю.Г.Пустовой