

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616-001.17

Осиков М.В.¹, Симонян Е.В.¹, Башарова О.Т.²

Влияние трансдермальной пленки с эритропоэтином на гибель лимфоцитов и процессы свободнорадикального окисления в крови при экспериментальной термической травме у крыс

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 454092, г. Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64;

²ООО «Завод Медсинтез», 620144, Свердловская область, г. Екатеринбург, Россия, ул. 8 Марта, д. 90А

Цель – изучение влияния эритропоэтина в составе трансдермальной пленки на характер гибели лимфоцитов и процессы свободнорадикального окисления в крови при экспериментальной термической травме у крыс.

Методика. Эксперименты выполнены на 90 белых нелинейных крысах-самцах массой 220±20 г. Животные были случайным образом разделены на 3 группы: группа 1 (n=10) – интактный контроль, группа 2 (n=40) – термическая травма с наложением на область ожога асептической повязки, группа 3 (n=40) – термическая травма с наложением на область ожога трансдермальной пленки с эритропоэтином. Термическую травму IIIA степени (площадь 3,5% поверхности) воспроизводили под общим наркозом погружением межлопаточной области кожи в очищенную воду (t= 98-99 °C). Эритропоэтин (42 МЕ/см²) в составе трансдермальной пленки (площадь 12 см²) наносили ежедневно сразу после травмы. Исследование крови проводили на 3-и, 5-е, 8-е и 14-е сут. Гибель лимфоцитов, выделенных из крови на градиенте плотности фиколл-верографин (1,077), оценивали при окрашивании клеток конъюгированным с флюорохромом аннексином V и 7-аминоактиномицином D. Дифференцировали интактные клетки, клетки с ранними признаками апоптоза, клетки с поздними признаками апоптоза и частично некротизированные клетки. Содержание продуктов ПОЛ оценивали спектрофотометрически, определяли активность супероксиддисмутазы в плазме, каталазы в плазме крови и эритроцитах.

Результаты. Показано, что при термической травме увеличивается количество лимфоцитов в крови с ранними и поздними признаками апоптоза и некроза, содержание диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов, оснований Шиффа в липидных экстрактах плазмы и лимфоцитов, возрастает также активность каталазы в плазме и эритроцитах, активность супероксиддисмутазы в плазме крови снижается. В условиях применения эритропоэтина в составе трансдермальной пленки наблюдается уменьшение количества лимфоцитов с ранними и поздними признаками гибели, снижается активность процессов ПОЛ в плазме и лимфоцитах, а также активность каталазы в плазме и эритроцитах и возрастает активность супероксиддисмутазы в плазме крови.

Заключение. Использование эритропоэтина в составе трансдермальной пленки при термической травме снижает выраженность гибели лимфоцитов, активность процессов ПОЛ, повышает активность супероксиддисмутазы в плазме крови по сравнению с группой животных с термической травмой без применения эритропоэтина.

Ключевые слова: термическая травма; эритропоэтин; трансдермальная пленка; гибель лимфоцитов; перекисное окисление липидов; супероксиддисмутаза; каталаза.

Для цитирования: Осиков М.В., Симонян Е.В., Башарова О.Т. Влияние трансдермальной пленки с эритропоэтином на гибель лимфоцитов и процессы свободнорадикального окисления в крови при экспериментальной термической травме у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 72-79 .

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02.72-79

Для корреспонденции: Башарова Оксана Тагировна, канд. биол. наук, инженер хроматографист, e-mail: osaedgalina@mail.ru
Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 08.12.2018

Osikov M. V.¹, Simonyan E. V.¹, Basharova O.T.²

EFFECT OF A TRANSDERMAL FILM WITH ERYTHROPOIETIN ON LYMPHOCYTE DEATH AND FREE RADICAL OXIDATION IN BLOOD OF RATS WITH EXPERIMENTAL THERMAL INJURY

¹ South Ural State Medical University, Vorovskogo Str. 64, Chelyabinsk 454092;

² OOO Zavod Medsintez, 8 Marta Str. 90a, Yekaterinburg 620144

Aim. Studying the effect of erythropoietin (EPO) as a component of the transdermal film (TDF) on lymphocyte apoptotic death and free radical oxidation in blood of rats with experimental thermal injury (TI) (trauma).

Methods. Experiments were performed on 90 white mongrel male rats weighing 220±20 g. The IIIA grade TI with a burn area of 3.5% body surface was induced under general anesthesia by immersing the interscapular region of the skin in purified water at 98-99°C. EPO (42 IU/cm²) as a component of the 12 cm² TDF was applied daily, immediately after the TI. The animals were randomized to three groups: group 1 (n=10), intact control; group 2 (n=40), TI with application of an aseptic dressing to the burn area; group 3 (n=40), TI with application of the EPO-containing TDF to the burn area. The study was conducted at days 3, 5, 8, and 14 after TI. Lymphocytes were isolated from blood using the ficoll-verographin density gradient (1.077) and their apoptosis was evaluated by staining the cells with fluorochrome-conjugated Annexin V (Annexin-5-FITC) and 7-aminoactinomycin D (7-AAD). The cells were differentiated into intact cells, cells with early apoptosis signs, cells with late apoptosis signs, and partially necrotized cells. Concentration of lipid peroxidation (LP) products was measured spectrophotometrically; superoxide dismutase (SOD) activity was measured in plasma and catalase activity was measured in plasma and red blood cells.

Results. TI increased the count of lymphocytes of the Annexin-5-FITC+/7-AAD (early apoptosis signs) and Annexin-5-FITC+/7-AAD+ (late apoptosis or necrosis signs) phenotypes, and concentrations of dienic conjugates, ketodienes, conjugated trienes, and Schiff bases in heptanol and isopropanol phases of plasma and lymphocyte lipid extracts. Plasma and red cell catalase activities were increased whereas plasma SOD activity was decreased. Application of EPO as a component of the TDF decreased the amount of lymphocytes with early and late apoptosis signs and the contents of dienic conjugates, conjugated ketodienes and trienes, Schiff bases in plasma and lymphocytes, and catalase activity in plasma and erythrocytes, and increased the plasma activity of SOD.

Conclusion. The use of EPO as a component of TDF in TI reduced lymphocyte apoptosis, activity of LP processes, and increased the plasma activity of SOD compared to the group of animals with TI without the EPO treatment.

Keywords: thermal injury; erythropoietin; transdermal film; lymphocyte death; lipid peroxidation; superoxide dismutase; catalase.

For citation: Osikov M.V., Simonyan E.V., Basharova O.T. Effect of transdermal film with erythropoietin on lymphocytes death and free radical oxidation in blood of rats with experimental thermal injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 72-79. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02. 72-79

For correspondence: *Basharova Oxana Tagirovna*, Candidate of Biological Sciences, engineer of chromatography, e-mail: osaedgalina@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 08.12.2018

Введение

Ежегодно более 1 млн человек в мире страдают от ожогов различной степени тяжести. Более 90% ожогов приходится на долю термической травмы (ТТ) [1-3]. Одной из причин развития осложнений при ТТ является активация лейкоцитов, эндотелиоцитов и тромбоцитов в очаге ТТ, что может стать причиной «респираторного взрыва», инициирования процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), гибели лимфоцитов, лимфоцитопении, депрессии адаптивного иммунитета и дисрегуляции иммунного ответа [4, 5]. В связи с этим, патогенетически обоснованным может быть локальное применение эритропоэтина (ЭПО). Ранее при различной патологии нами были продемонстрированы плейотропные эффекты ЭПО,

включающие нефроцитопротекторное, нейропротекторное, иммунотропное действие [6, 7]. ЭПО привлекает внимание своими репаративными эффектами и антиоксидантными свойствами, которые при ТТ могут способствовать ограничению зоны вторичной альтерации [8, 9]. Цель работы – изучить влияние эритропоэтина в составе трансдермальной пленки на гибель лимфоцитов и процессы свободнорадикального окисления в крови при экспериментальной термической травме у крыс.

Методика

Исследования выполнены в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных живот-

ных (ETS № 123 от 18.03.1986, Страсбург) и рекомендациями Директивы 2010/63/EU от 22.09.10 по охране животных, используемых в научных целях. Работа была одобрена локальным этическим комитетом университета. Эксперименты выполнены на 90 белых нелинейных крысах-самцах массой 220 ± 20 г. Животные были случайным образом разделены на 3 группы: группа 1-я ($n=10$) – интактный контроль, 2-я ($n=40$) – ТТ с наложением на область ожога асептической повязки (группа ТТ), 3-я ($n=40$) – ТТ с наложением на область ожога трансдермальной пленки (ТДП) с ЭПО (группа ТТ+ТДП с ЭПО). Моделирование термической травмы IIIA степени (СТ IIIA) площадью 3,5% поверхности тела осуществляли под общей анестезией (Золетил «VirbacSanteAnimale», Франция) погружением участка межлопаточной области спины животного в горячую очищенную воду с температурой $98-99$ °C на 12 с. Через 24 ч после моделирования ТТ проводили иссечение некротизированных участков раны. Глубину поражения верифицировали морфологическими методами. Пленку с ЭПО животным 3-й группы наносили сразу после ТТ, меняя ежедневно и закрепляя асептической повязкой. Асептическую повязку у животных в 2-й и 3-й группах меняли ежедневно.

Состав трансдермальной пленки с эритропоетином. В предварительных исследованиях был разработан состав ТДП на основе натрия карбоксиметилцеллюлозы, в который был включен с концентрацией 42 МЕ/см² ЭПО («Эпокрин», ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА, Россия), и проведена ее оценка в соответствии с фармакотехнологическими параметрами: органолептические показатели (внешний вид, цвет, прозрачность, эластичность, наличие посторонних примесей и микротрещин под микроскопом), адгезивная способность, механическая прочность на разрыв, толщина. По результатам проведенных исследований получен патент на изобретение.

Оценка гибели лимфоцитов крови. Исследования проводили на 3-и, 5-е, 8-е и 14-е сут ТТ. Забор крови осуществлялся под общим наркозом после вскрытия грудной клетки пункцией сердца в области левого желудочка. Гибель лимфоцитов, выделенных из крови на градиенте плотности фиколл-верографин (1,077), оценивали при окрашивании клеток конъюгированным с флюорохромом аннексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) из набора «Annexin 5 - FITC/7-AADkit» («BeckmanCoulter», США) на точном цитофлуориметре «Navios» («BeckmanCoulter», США). Дифференцировали интактные клетки (Annexin-5-FITC-/7-AAD-), клетки с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-), клетки с поздними признаками апоптоза и частично не-

кротизированные клетки (Annexin-5-FITC+/7-AAD+). Результат выражали в % от общего числа подсчитанных клеток. Содержание продуктов ПОЛ оценивали спектрофотометрически в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта лимфоцитов и плазмы по методу Волчегорского И.А. и соавт [10], определяли E232/E220 (первичные продукты ПОЛ – диеновые конъюгаты (ДК), E278/E220 (вторичные продукты ПОЛ – кетодиены и сопряженные триены (КД и СТ) и E400/E220 (конечные продукты ПОЛ – Шиффовы основания (ШО)). Результаты выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.) Активность супероксиддисмутазы (СОД) в плазме оценивали по методу Чевари С., Чаба И., Секей И [11], результат выражали в условных единицах на 1 мл сыворотки (ЕД/мл). Активность каталазы в плазме и в эритроцитах оценивали по методу Королюка М.А. и соавторов в модификации Коробейниковой Э.Н. [12, 13]. Результат выражали в мкат/л.

Статистическая обработка результатов. Результаты обрабатывали с использованием программы «Statistica 6.0». Характеристика выборки представлена в формате $Me (Q_{25}-Q_{75})$. Для оценки значимости различий между группами применяли критерии Манна – Уитни, Вальда – Вольфовитца, Краскела-Уоллиса, для корреляционного анализа использовали коэффициент Спирмена. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Оценка гибели лимфоцитов в крови. При экспериментальной ТТ на 3-и, 5-е и 8-е сут количество лимфоцитов с ранними признаками апоптоза в крови увеличивалось на 51%, 108% и 172% соответственно, а количество клеток с поздними признаками апоптоза и признаками некроза - на 850%, 900% и 4500% соответственно. На 14-е сут количество клеток с ранними и поздними признаками апоптоза и/или некроза статистически значимо не отличалось от группы интактных животных (табл. 1). Количество интактных лимфоцитов снижается на 5-е и 8-е сут ТТ на 10,6% и 18,2% соответственно и статистически значимо не изменяется на 3-и и 14-е сут по сравнению с интактными.

При оценке влияния ТДП с ЭПО при ТТ на показатели гибели лимфоцитов в крови установлено, что количество клеток с ранними признаками апоптоза статистически значимо не изменялось на 3-и и 8-е сут, и снижалось на 5-е, 14-е сут на 61,5% и 92,6% соответственно относительно группы крыс с ТТ, достигая при этом значений в группе интактных животных (табл. 1). Количество в крови лимфоцитов с поздними призна-

ками апоптоза и/или некроза статистически значимо не изменялось на 3-и и 5-е сут, снижалось на 8-е и 14-е сут на 65,6% и 50% соответственно, достигая на 14-е сут значений в группе интактных животных. Количество интактных лимфоцитов в крови статистически значимо не изменялось относительно группы с ТТ на 3-и и 8-е сут применения ТДП с ЭПО при ТТ и увеличивалось на 5-е и 14-е сут, на 8,5% и 6,3%, достигая значений в группе интактных животных.

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в плазме и лимфоцитах. Данные по содержанию продуктов ПОЛ в плазме и лимфоцитах представлены в таблице 2. Установлено, что при ТТ в гептановой фазе липидного экстракта плазмы содержание диеновых конъюгатов увеличивалось на 3-и сут на 32,5% и снижалось на 5-е сут на 32% относительно группы интактных животных (табл. 2). На 8-е и 14-е сут содержание первичных продуктов ПОЛ статистически значимо не изменялось. Содержание кетодиенов и сопряженных триенов статистически значимо не изменялось на 3-и, 5-е, 8-е и 14-е сут ТТ. Содержание оснований Шиффа увеличивалось на 3-и, 5-е и 14-е сут ТТ на 100%, 150% и 250% соответственно и статистически значимо не изменялось на 8-е сут относительно группы интактных животных.

В изопропанольной фазе липидного экстракта плазмы содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ статистически значимо не изменялось на 3-и,

5-е, 8-е и 14-е сут ТТ, содержание конечных продуктов ПОЛ увеличивалось на 3-и, 5-е и 8-е сут ТТ на 450%, 800% и 2400% соответственно и статистически значимо не изменялось на 14-е сут (табл. 2).

При местном применении ТДП с ЭПО при ТТ в гептановой фазе липидного экстракта плазмы содержание диеновых конъюгатов статистически значимо снижалось на 3-и, 8-е и 14-е сут на 91,2%, 14,3%, 30% соответственно, на 5-е сут статистически значимо не изменялись. Содержание кетодиенов и сопряженных триенов снижалось на 80%, 73%, 75,8% и 80% на 3-и, 5-е, 8-е и 14-е сут соответственно, а содержание оснований Шиффа значимо снижалось (на 100%) на 8-е сут, изменения на 3-и, 5-е и 14-е сут статистически не были значимы (табл. 2).

В изопропанольной фазе липидного экстракта плазмы в условиях применения ТДП с ЭПО в содержании первичных продуктов ПОЛ статистически значимых изменений не выявлено (табл. 2). Содержание вторичных продуктов ПОЛ статистически значимо не изменялось на 3-и, 5-е и 8-е сут и снижалось (на 25,9%) на 14-е сут. Содержание оснований Шиффа снижалось на 8-е сут на 100%, а изменения на 3-и, 5-е и 14-е сут были статистически не значимы.

В гептановой фазе липидного экстракта лимфоцитов отмечалось увеличение содержания диеновых конъюгатов на 25,4%, 239% и 26,8% на 3-и, 5-е и 8-е сут соответственно, кетодиенов и сопряженных трие-

Таблица 1

Влияние трансдермальной пленки с эритропозтином на показатели гибели лимфоцитов в крови при экспериментальной термической травме (Me (Q₂₅-Q₇₅))

Показатели (% клеток от общего числа)	Группы животных								
	Интактные	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО
		3-и сут		5-е сут		8-е сут		14-е сут	
Annexin-5-FITC-/7-AAD-, (интактные клетки)	91,90 (81,80-93,10)	90,20 (84,00-93,90)	86,40 (85,10-87,05)	82,10 (80,00-84,8)*	89,15 (81,50-92,35)\$	75,15 (69,15-79,65)*	75,80 (73,60-83,70)	93,45 (89,35-96,90)	99,30 (99,20-99,40)@
Annexin-5-FITC+/7-AAD-, (ранние признаки апоптоза)	7,85 (7,25-8,35)	11,90 (7,30-17,65)*	12,45 (11,10-14,00)	16,40 (14,70-18,80)*	6,30 (4,90-13,90)\$	21,40 (19,00-26,90)*	22,60 (15,55-24,25)	8,10 (4,20-11,40)	0,60 (0,35-0,70)@
Annexin-5-FITC+/7-AAD+, (поздние признаки апоптоза)	0,10 (0,10-0,30)	0,95 (0,55-1,40)*	0,95 (0,75-1,50)	1,00 (0,75-1,25)*	1,50 (0,00-2,20)	4,65 (2,50-7,40)*	1,60 (0,75-2,15)&	0,10 (0,10-0,40)	0,05 (0,00-0,10)@

Примечание. * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой интактных животных; # – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой ТТ на 3-и сутки; \$ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой ТТ на 5-е сутки; & – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой ТТ на 8-е сут; @ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой ТТ на 14-е сут

нов на 30,7% и 80,7% на 3-и и 5-е сут ТТ соответственно. Содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ статистически значимо не изменялось на 8-е и 14-е сут (табл. 2). Изменений в содержании оснований Шиффа при ТТ не отмечалось.

Содержание диеновых конъюгатов в изопропанольной фазе липидного экстракта лимфоцитов при ТТ на 3-и, 5-е и 8-е сут возрастало на 22,7%, 9,1% и 21,6%, еще более существенно возрастал уровень кетодиенов и сопряженных триенов на 187,5%, 250% и 162,5% соответственно. На 14-е сут ТТ содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ статистически значимо не изменялось (табл. 2). Содержание основа-

ний Шиффа статистически значимо не изменялось на 3-и, 5-е и 14-е сут и возрастало на 8-е сут (на 133,3%) относительно группы интактных животных.

В условиях применения ТДП с ЭПО в гептановой фазе липидного экстракта лимфоцитов содержание первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ статистически значимо не изменялось относительно показателей группы с ТТ (табл. 2). В изопропанольной фазе содержание диеновых конъюгатов значимо снижалось только на 3-и сут (на 24%), достигая значений в группе интактных животных. Содержание кетодиенов и сопряженных триенов значимо снижалось только на 3-и и 8-е сут на 91,3% и 47,6% соответственно.

Таблица 2

Влияние трансдермальной пленки с эритропозтином на содержание продуктов перекисного окисления липидов в плазме и лимфоцитах при экспериментальной термической травме (Me (Q₂₅-Q₇₅))

Показатели	Группы животных								
	Интактные	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО
		3-и сут			5-е сут		8-е сут		14-е сут
Плазма									
ДК, е.и.о. (г)	0,43 (0,43-0,45)	0,57 (0,40-0,75)*	0,05 (0,05-0,13)#	0,29 (0,25-0,31)*	0,39 (0,25-0,40)	0,42 (0,36-0,44)	0,36 (0,00-0,37)&	0,3 (0,34-0,69)	0,21 (0,11-0,21)@
КД и СТ, е.и.о. (г)	0,15 (0,13-0,16)	0,15 (0,08-0,25)	0,03 (0,01-0,06)#	0,26 (0,11-0,51)	0,07 (0,05-0,19)\$	0,29 (0,14-0,35)	0,07 (0,07-0,09)&	0,15 (0,08-0,26)	0,03 (0,02-0,03)@
ШО, е.и.о. (г)	0,02 (0,00-0,03)	0,04 (0,03-0,08)*	0,04 (0,03-0,06)	0,05 (0,03-0,13)*	0,05 (0,03-0,09)	0,03 (0,00-0,06)	0,00 (0,00-0,01)&	0,07 (0,02-0,11)*	0,06 (0,02-0,08)
ДК, е.и.о. (и)	0,35 (0,33-0,36)	0,37 (0,31-0,46)	0,24 (0,15-0,37)	0,40 (0,31-0,40)	0,40 (0,39-0,44)	0,39 (0,39-0,40)	0,38 (0,37-0,39)	0,37 (0,35-0,47)	0,33 (0,22-0,46)
КД и СТ, е.и.о. (и)	0,24 (0,23-0,25)	0,22 (0,19-0,23)	0,24 (0,19-0,27)	0,240 (0,24-0,24)	0,28 (0,25-0,31)	0,22 (0,19-0,22)	0,19 (0,19-0,22)	0,27 (0,21-0,28)	0,20 (0,20-0,22)@
ШО, е.и.о. (и)	0,002 (0,000-0,008)	0,011 (0,006-0,020)*	0,030 (0,010-0,060)	0,018 (0,012-0,028)*	0,010 (0,010-0,040)	0,050 (0,020-0,060)*	0,000 (0,000-0,010)&	0,009 (0,000-0,040)	0,030 (0,010-0,070)
Лимфоциты									
ДК, е.и.о. (г)	0,59 (0,55-0,67)	0,74 (0,72-0,81)*	0,45 (0,00-0,90)	2,00 (0,00-3,75)*	0,43 (0,40-0,78)	0,55 (0,28-0,85)*	0,70 (0,60-1,00)	0,36 (0,20-0,52)	0,29 (0,00-0,90)
КД и СТ, е.и.о. (г)	0,26 (0,25-0,28)	0,34 (0,26-0,38)*	0,43 (0,00-0,53)	0,47 (0,25-1,17)*	0,47 (0,00-0,61)	0,14 (0,04-0,45)	0,30 (0,05-0,33)	0,35 (0,19-0,52)	0,60 (0,00-0,82)
ШО, е.и.о. (г)	0,10 (0,07-0,13)	0,22 (0,22-0,32)	0,17 (0,10-0,33)	0,25 (0,00-0,33)	0,27 (0,17-0,39)	0,15 (0,00-0,33)	0,10 (0,07-0,33)	0,12 (0,00-0,21)	0,14 (0,10-0,18)
ДК, е.и.о. (и)	0,88 (0,66-1,02)	1,08 (1,06-1,12)*	0,82 (0,38-0,92)#	0,96 (0,89-1,52)*	0,80 (0,76-1,40)	1,07 (0,89-1,14)*	1,00 (0,71-1,10)	0,95 (0,77-1,05)	0,92 (0,90-0,92)
КД и СТ, е.и.о. (и)	0,08 (0,00-0,37)	0,23 (0,14-0,45)*	0,02 (0,00-0,17)#	0,28 (0,21-0,36)*	0,22 (0,10-0,25)	0,21 (0,19-0,25)*	0,11 (0,10-0,13)&	0,23 (0,12-0,30)	0,21 (0,18-0,27)
ШО, е.и.о. (и)	0,03 (0,02-0,06)	0,07 (0,03-0,11)	0,03 (0,00-0,03)	0,10 (0,02-0,13)	0,10 (0,06-0,16)	0,07 (0,05-0,09)*	0,03 (0,03-0,04)&	0,05 (0,02-0,08)	0,08 (0,03-0,11)

Примечание. * – статистически значимые различия (p<0,05) с группой интактных животных; # – статистически значимые различия (p<0,05) с группой ТТ на 3-и сут; \$ – статистически значимые различия (p<0,05) с группой ТТ на 5-е сут; & – статистически значимые различия (p<0,05) с группой ТТ на 8-е сут; @ – статистически значимые различия (p<0,05) с группой ТТ на 14-е сут; г - гептановая, и - изопропанольная.

Содержание оснований Шиффа на 8-е сут снижалось до уровня интактных животных.

Активность ферментов антиоксидантной системы в крови при экспериментальной термической травме. Активность СОД в плазме при ТТ на 3-и, 8-е и 14-е сут снижалась на 38,6%, 41,7% и 87,7% соответственно, на 5-е сут статистически значимо не изменялась (табл. 3). Активность каталазы в плазме возрастала на 5-е и 8-е сут ТТ на 51,2% и 39,3% соответственно и статистически значимо не изменялась на 3-и и 14-е сут. Активность каталазы в эритроцитах увеличивалась на 5-е, 8-е и 14-е сут ТТ относительно группы интактных животных на 87,1%, 368% и 92,6% соответственно.

При ТТ в условиях местного применения пленки с ЭПО активность СОД в плазме увеличивалась на 3-и, 8-е и 14-е сут на 25,1%, 89,5% и 82,2% соответственно. Изменений на 5-е сут не отмечалось. При этом на 8-е и 14-е сут показатели активности достигали значений интактных животных (табл. 3). Активность каталазы в плазме снижалась на 5-е и 8-е сут на 36,7% и 33,5%, достигая значений животных интактной группы. Изменений на 3-и и 14-е сут выявлено не было. Активность каталазы в эритроцитах возрастала на 3-и сут (на 5%) и снижалась на 5-е, 8-е и 14-е сут (на 68%, 84,2% и 33% соответственно). Отметим, что на 5-е и 8-е сут активность каталазы достигала значений интактных животных.

Мы считаем, что увеличение количества лимфоцитов в крови с признаками апоптоза и/или некроза при ТТ может быть связано с увеличением concentra-

ции в крови проапоптогенных цитокинов, например ФНО- α , свободных радикалов и другими факторами [14, 15]. При проведении корреляционного анализа установлена прямая статистически значимая сильная связь между содержанием лимфоцитов в крови с ранними признаками апоптоза и содержанием оснований Шиффа в изопропанольной фазе липидного экстракта плазмы (на 8-е сут $R=0,96; p<0,05$), содержанием кетодиенов и сопряженных триенов в изопропанольной фазе липидного экстракта лимфоцитов (на 5-е сут $R=0,95; p<0,05$) и содержанием диеновых конъюгатов в изопропанольной фазе липидного экстракта лимфоцитов (на 8-е сут $R=0,79; p<0,05$).

Как известно, продукты ПОЛ в гептановой фазе липидного экстракта плазмы и лимфоцитов содержат основную часть триацилглицеридов (резервных липидов), а продукты ПОЛ в изопропанольной фазе — основную часть фосфолипидов. По данным ряда исследователей [16] накопление продуктов ПОЛ зависит от глубины и площади повреждения: при поверхностных ожоговых повреждениях в большей степени увеличивается содержание конечных продуктов ПОЛ, в частности малонового диальдегида, а при глубоких повреждениях — содержание первичных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов). Увеличение содержания диеновых конъюгатов связано с активацией биосинтеза простагландинов, лейкотриенов и цитокинов — факторов хемотаксиса лейкоцитов, которым в качестве субстрата необходимы полиненасыщенные жирные кислоты с сопряженными связями [16]. Активация при

Таблица 3

Влияние трансдермальной пленки с эритропоэтином на активность ферментов антиоксидантной защиты в крови при экспериментальной термической травме (Me (Q₂₅-Q₇₅))

Показатели	Группа								
	Интактные	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО	ТТ	ТТ+ ТДП с ЭПО
		3 сут		5 сут		8 сут		14 сут	
СОД плазмы, Ед/мл	1,63 (1,39-1,78)	1,00 (1,00- 1,14)*	1,22 (1,20- 1,25)#	1,15 (0,75- 1,55)	1,07 (1,05-1,15)	0,95 (0,90- 1,40)*	1,80 (1,80- 1,80)&	0,20 (0,15- 0,90)*	1,54 (1,52- 1,57)@
Каталаза плазмы, мкат/л	21,10 (20,50- 22,20)	18,30 (15,80- 25,70)	25,60 (16,80- 25,80)	31,90 (28,60- 37,40)*	20,20 (18,50- 24,60)\$	29,40 (26,2- 49,4)*	19,55 (14,85- 25,10)&	22,90 (20,10- 26,10)	16,40 (16,40- 39,70)
Каталаза эритро- цитов, мкат/л	6,36 (5,60-6,70)	6,20 (4,30- 6,40)	6,52 (5,98- 7,20)#	11,90 (10,60- 12,00)*	3,80 (2,70- 4,80)\$	29,80 (28,50- 30,60)*	4,70 (3,70-4, 80)&	12,25 (12,00- 14,10)*	8,20 (7,50- 8,60)@

Примечание. * — статистически значимые различия ($p<0,05$) с группой интактных животных; # — статистически значимые различия ($p<0,05$) с группой ТТ на 3 сут; \$ — статистически значимые различия ($p<0,05$) с группой ТТ на 5 сут; & — статистически значимые различия ($p<0,05$) с группой ТТ на 8 сут; @ — статистически значимые различия ($p<0,05$) с группой ТТ на 14 сут.

ТТ некоторых ферментов антиоксидантной защиты, в частности каталазы в крови может быть связана с высвобождением ее из поврежденных тканей в ответ на разрушение эритроцитов, которые, как известно, могут стать причиной инициации процессов свободно-радикального окисления. Вероятно, снижение активности СОД в плазме обусловлено не только активацией продукции АФК нейтрофилами, но также разрушением эритроцитов при ТТ [17].

Одним из механизмов прямого и/или опосредованного действия ЭПО в составе ТДП при ТТ может быть изменение процессов свободно-радикального окисления, активности некоторых ферментов антиоксидантной защиты в крови. Так, нами установлена сильная отрицательная статистически значимая корреляция между активностью СОД в крови и содержанием первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе липидного экстракта лимфоцитов на 3-и сут применения ТДП с ЭПО при ТТ ($R = -0,98$; $R = -0,73$; $R = -0,91$, $p < 0,05$ соответственно).

По данным литературы, при подкожном введении ЭПО в разовой дозе 500 МЕ/кг мышам с повреждениями кожи на 7 сут снижается содержание в крови малонового диальдегида, преимущественно за счет снижения выработки активных форм кислорода и медиаторов воспаления [18]. Положительный эффект эритропоэтина отмечался и при других патологических процессах [19].

Выводы

1. При экспериментальной термической травме по сравнению с интактными животными в крови увеличивается количество лимфоцитов с ранними и поздними признаками апоптоза и/или признаками некроза, содержание продуктов перекисного окисления липидов в гептановой и изопропанольной фазах липидных экстрактов плазмы и лимфоцитов, активность каталазы в плазме и эритроцитах, снижается активность супероксиддисмутазы в плазме крови.

2. В условиях применения трансдермальной пленки с эритропоэтином при экспериментальной термической травме наблюдается снижение количества лимфоцитов в крови с ранними и поздними признаками апоптоза и/или признаками некроза, содержания продуктов перекисного окисления липидов в плазме и лимфоцитах, активности каталазы в плазме и эритроцитах, увеличение активности супероксиддисмутазы в плазме крови относительно группы животных с термической травмой.

Литература

1. Алексеев А.А., Бобровников А.Э., Крутиков М.Г., Тюрников Ю.И., Богданов С.Б. Местное консервативное лечение ран на этапах оказания помощи пострадавшим от ожогов: клинические рекомендации. *Общероссийская общественная организация «Объединение комбустиологов «Мир без ожогов»*. 2014: 1-17.
2. Ожоги. Информационный бюллетень № 365 от 2016 г. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/ru/>
3. Rani M., Schwacha M.G. Aging and the pathogenic response to burn. *Aging dis.* 2012; 3(2): 171–80.
4. Shalom A., Kramer E., Westreich M. Protective effect of human recombinant copper–zinc superoxide dismutase on zone of stasis survival in burns in rats. *Ann plasturg.* 2011; 66(6): 607–9.
5. Дубинина Е.Е. *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение)*. Санкт–Петербург; Мед. прессы; 2006.
6. Осиков М.В., Григорьев Т.А. Влияние эритропоэтина на активность системы плазменного протеолиза при экспериментальной почечной недостаточности. *Бюл. экспериментальной биологии и медицины*. 2012, 153(1): 27–30.
7. Осиков М.В., Ахматов В.Ю., Телешева Л.Ф., Федосов А.А., Агеев Ю.И., Суровяткина Л.Г. Плейотропные эффекты эритропоэтина при хронической почечной недостаточности. *Фундаментальные исследования*. 2013; 7(1): 218–24. Available at: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=31817>.
8. Tobalem M., Harder Y., Rezaeian F., Wettstein R. Secondary burn progression decreased by erythropoietin. *Crit Care Med.* 2013; 41(4): 963–71.
9. Giri P., Ebert S., Braumann U.D., Kremer M., Giri S., Machens H.G., Bader A. Skin regeneration in deep second-degree scald injuries either by infusion pumping or topical application of recombinant human erythropoietin gel. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 2565–79.
10. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. *Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма*. Челябинск; Изд-во ЧелГПУ; 2000.
11. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. *Лабораторное дело*. 1985; 11: 678–81.
12. Коралюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Определение активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988; 1: 16–9.
13. Коробейникова Э.Н., Зурочка А.В., Евдокимова Е.В. *Показатели липидного обмена в сыворотке крови практически здорового населения, проживающего в Южно–Уральском регионе в условиях адаптации к климатическим и техногенным воздействиям: методические указания*. Челябинск; Изд-во ЧелГМА; 2002.
14. Deveci M., Eski M., Sengezer M., Kisa U. Effects of cerium nitrate bathing and prompt burn wound excision on IL–6 and TNF– α levels in burned rats. *Burns*. 2000, 26(1): 41–5.
15. Kawakami M., Kaneko N., Anada H., Terai C., Okada Y. Measurement of interleukin–6, interleukin–10, and tumor necrosis factor– α levels in tissues and plasma after thermal injury in mice. *Surgery*. 1997; 121 (4): 440–8.
16. Николаев В.М., Алексеев С.Н., Алексеев Р.З. Перекисное окисление липидов у больных с холодовой травмой разной степени тяжести. *Наука и образование*. 2006; 2: 140–4.

17. Leff J.A., Burton L.K., Berger E.M., Anderson B.O., Wilke C.P., Repine J.E. Increased serum catalase activity in rats subjected to thermal skin injury. *Inflammation*. 1993; 17(2): 199–204.
18. Sayan H., Ozacmak V.H., Guven A., Aktas R. G., Ozacmak I.D. Erythropoietin stimulates wound healing and angiogenesis in mice. *J. of investigative surgery*. 2006; 19: 163–73.
8. Tobalem M., Harder Y., Rezaeian F., Wettstein R. Secondary burn progression decreased by erythropoietin. *Crit Care Med*. 2013; 41(4): 963–71.
9. Giri P., Ebert S., Braumann U.D., Kremer M., Giri S., Machens H.G., Bader A. Skin regeneration in deep second-degree scald injuries either by infusion pumping or topical application of recombinant human erythropoietin gel. *Drug Des Devel Ther*. 2015; 9: 2565–79.
10. Volchegorskiy I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L., Tseylikman V.Eh., Tishevskaya N.V. *Experimental modeling and laboratory evaluation of adaptive reactions of the organism*. Chelyabinsk; Izd-vo CHELGPU; 2000. (in Russian)

References

1. Alekseev A.A., Bobrovnikov A.Eh., Krutikov M.G., Tyurnikov Yu.I., Bogdanov S.B. Mast conservative treatment of wounds at the stages of rendering assistance to victims of burns: Clinic recommendations [Mestnoe konservativnoe lechenie ran na etapakh okazaniya pomoshchi postradavshim ot ozhogov: klinicheskie rekomendatsii.] *Obshcherossiyskaya obshchestvennaya organizatsiya «Ob"edinenie kombustologov «Mir bez ozhogov»*. 2014: 1–17. (in Russian)
2. Burns. *Informatsionnyy byulleten' № 365 of 2016 g*. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/ru/> (Accessed 25 May 2018)
3. Rani M., Schwacha M.G. Aging and the pathogenic response to burn. *Aging dis*. 2012; 3(2): 171–80.
4. Shalom A., Kramer E., Westreich M. Protective effect of human recombinant copper–zinc superoxide dismutase on zone of stasis survival in burns in rats. *Ann plasturg*. 2011; 66(6): 607–9.
5. Dubinina E.E. *Products of oxygen metabolism in the functional activity of cells (life and death, song and destruction) [Produkty metabolizma kisloroda v funktsional'noy aktivnosti kletok (zhizn' i smert', sozidanie i razrushenie)]*. Sankt–Peterburg; Med. pressa; 2006. (in Russian)
6. Osikov M.V., Grigor'ev T.A. Influence of the retina on the activity of the plasma system in experimental high position to distract. *Byul. ehksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2012, 153(1): 27–30. (in Russian)
7. Osikov M.V., Ahmatov V.Yu., Telesheva L.F., Fedosov A. A., Ageev Yu. I., Surovyatkina L.G. Pleiotropic effects of erythropoietin in chronic renal failure. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013; 7(1): 218–24. Available at: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=31817>. (Accessed 25 May 2018) (in Russian)
11. CHEvari S., CHaba I., Sekej I. The role of superoxide dismutase in kill cell process and the method of determining it in biological materials. *Laboratornoe delo*. 1985; 11: 678–81. (in Russian)
12. Koralyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V. E. Determination of catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988; 1: 16–9. (in Russian)
13. Korobeynikova Eh.N., Zurochka A.V., Evdokimova E.V. *Indicators of lipid metabolism in blood serum of healthy population living in the South Ural region in the conditions of adaptation to climatic and man-made impacts: guidelines*. Chelyabinsk; Izd-vo CHELGMA; 2002. (in Russian)
14. Deveci M., Eski M., Sengezer M., Kisa U. Effects of cerium nitrate bathing and prompt burn wound excision on IL–6 and TNF– α levels in burned rats. *Burns*. 2000, 26(1): 41–5.
15. Kawakami M., Kaneko N., Anada H., Terai C., Okada Y. Measurement of interleukin–6, interleukin–10, and tumor necrosis factor– α levels in tissues and plasma after thermal injury in mice. *Surgery*. 1997; 121(4): 440–8.
16. Nikolaev V.M., Alekseev S.N., Alekseev R.Z. Lipid peroxidation in patients with cold injury of varying severity. *Nauka i obrazovanie*. 2006, 2: 140–4. (in Russian)
17. Leff J.A., Burton L.K., Berger E.M., Anderson B. O., Wilke C. P., Repine J. E. Increased serum catalase activity in rats subjected to thermal skin injury. *Inflammation*. 1993; 17(2): 199–204.
18. Sayan H., Ozacmak V.H., Guven A., Aktas R. G., Ozacmak I. D. Erythropoietin stimulates wound healing and angiogenesis in mice. *J. of investigative surgery*. 2006, 19: 163–73.

Сведения об авторах:

Осиков Михаил Владимирович, зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, доктор мед. наук, проф.;

Симонян Елена Владимировна, зав. каф. фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, канд. фарм. наук, доцент;

Башарова Оксана Тагировна, канд. биол. наук, инженер-хроматографист ООО «Завод Медсинтез».