

УДК [579.841.11:616-001.17-092.9]-085.262.453.2-085.246.2:57.088.6

Г.М. Чернякова, В.В. Мінухін, Т.В. Горбач

Харківський національний медичний університет

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ МИШЕЙ З ОПІКОВОЮ PSEUDOMONAS-ІНФЕКЦІЄЮ ПРИ ЛІКУВАННІ НОВИМИ АПЛІКАЦІЙНИМИ СОРБЕНТАМИ

Термічна травма безпосередньо пов'язана з біохімічними змінами, які відбуваються в макроорганізмі. Порівнювали рівні перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), загальної антиоксидантної активності та гострофазових білкових показників сироватки крові у тварин з опіковою *Pseudomonas*-інфекцією під час лікування експериментальними аплікаційними сорбентами та маззю з сульфадіазином срібла. Було показано, що у тварин, яких лікували аплікаційним сорбентом з левофлоксацином, знижувався рівень ПОЛ вже на 2-й тиждень і підвищувався рівень загальної антиоксидантної активності до 3-го тижня, що вказувало на позитивну динаміку. Нормалізація рівнів гострофазових білків відбулася вже на 14-ту добу. Отже, можна припустити, що використання аплікаційного сорбенту з левофлоксацином прискорює нормалізацію біохімічних показників макроорганізму і, таким чином, впливає на більш ранній початок загоєння інфікованої опікової рани в експерименті.

Ключові слова: опікова інфекція, аплікаційний сорбент, перекисне окиснення ліпідів, С-реактивний білок, гострофазові білки.

Вступ

За даними ВООЗ, опікова травма займає 3-тє місце серед усіх видів травматизму. В останні роки спостерігається тенденція до збільшення кількості постраждалих від опіків. Важка термічна травма є серйозним ушкоджуючим фактором для всього організму із-за порушення функцій гемодинаміки, травного тракту, печінки, нирок, метаболізму, імунітету тощо [1]. Все це сприяє появі медіаторів запалення і більш вираженому окислювальному стресу та ендогенній інтоксикації [2].

Незважаючи на створення багатьох нових ліків, ідеального препарату для нанесення на ушкоджену опіками шкіру досі не винайдено. Інфікована опікова рана потребує своєчасної антибактеріальної, протизапальної та детоксикаційної терапії. Тому нашу увагу привернув метод аплікаційної сорбції [3]. Місцеве використання сорбційних препаратів дозволяє знизити рівень продуктів розпаду бактерій та їх токсинів, що сприяє прискореному загоєванню ран [4]. Поєднання сорбенту з антибіотиком, на нашу думку, дасть змогу максимально ефективно впливати на інфекційний процес в опіковій рані.

Метою даного дослідження було вивчити показники перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), загальної антиоксидантної активності та оцінити рівень гострофазових показників запалення на моделі інфікованої термічної травми у мишей при лікуванні експериментальними аплікаційними сорбентами.

Матеріал і методи

Дослідження проводилося на 6-місячних мишах-самцях лінії NMRI масою 18–20 г. Для експериментів була використана модель контактного термічного опіку [5]. Безпосередньо після нанесення травми тваринам нашкірно інокулювали 0,1 мл добової агарової культури *P. aeruginosa*, яку було виділено від хворого з опіками. На 2-гу добу під опіковий струп вводили аналогічну дозу збудника. На 3-й день під місцевою анестезією опіковий струп видаляли. Всі експериментальні тварини були поділені на шість груп по 18 мишей у кожній. 1-ша група – інтактні тварини, 2-га – тварини без лікування; 3-тя – тварини, яких місцево лікували сорбентом на основі високодисперсного кремнезему; 4-та – тварини, яким на рану наносили аплікаційний сорбент на основі високодисперсного кремнезему з левофлок-

© Г.М. Чернякова, В.В. Мінухін, Т.В. Горбач, 2017

сацином та іншими компонентами; 5-та – тварини, які місцево отримували розроблений сорбент на основі високодисперсного кремнезему з сульфаметоксазолом і іншими компонентами; 6-та – тварини, яким наносили мазь з 1% сульфадіазину срібла. Дослідження проводили на 7-му, 14-ту, 21-шу добу лікування.

Вміст продуктів ПОЛ вивчали за рівнем ТБК-активних продуктів у сироватці крові. Стан антиоксидантної системи (АОС) оцінювали за показником загальної антиоксидантної активності сироватки крові, який вимірювали спектрофотометричним методом. Рівні гаптоглобіну, церулоплазміну, серомукоїдів та С-реактивного білка (СРБ) оцінювали за допомогою турбідиметричного методу. Статистичну обробку результатів проводили з використанням стандартних програм. Достовірність отриманих результатів визначали за критерієм Стьюдента ($p < 0,05$).

Результати та їх обговорення

Як відомо, концентрація ТБК-активних продуктів у сироватці крові відображає активність процесів ПОЛ в організмі хворого і є маркером ендогенної інтоксикації. В 2-й групі тварин на 7-му добу спостерігалось достовірне підвищення цього показника в 3 рази порівняно з інтактними тваринами, в 4-й та 6-й групах – в 2,7 рази, в 5-й – в 2,5, в 3-й – в 2,8 рази відповідно ($p < 0,01$). З 7-ї по 14-ту добу спостереження відмічали зниження показника в середньому по групах тварин: у 2-й – на 34%, у 3-й – на 19%, у 4-й – на 81%, у 5-й – на 20%, у 6-й – на 46% (табл. 1). Найкращий результат спостерігався в групі тварин, які отримували аплікаційний сорбент з левофлоксацином. Це може свідчити про ефективність комплексного використання антибіотика фторхінолонового ряду і сорбенту. Дана комбінація призводила до достовірного зниження ($p < 0,001$) показників ПОЛ у цій групі тварин

вже на 2-му тижні лікування. Використання сорбенту з сульфаметоксазолом сприяло незначному зниженню вказаного показника. У тварин, яких лікували препаратом порівняння – маззю з сульфадіазиним срібла, спостерігали також достовірне зниження рівня ТБК-активних продуктів, але не настільки інтенсивне, як у 4-й групі. До 21-ї доби цей параметр продовжував змінюватися та знизився в 2-й групі на 60,7%, у 3-й – на 61,6%, у 4-й – на 77,6%, у 5-й – на 54%, у 6-й – на 63,8% порівняно з 7-м днем. Таким чином, найбільш активно процес нормалізації рівня ТБК-активних продуктів відбувався у 4-й та 6-й групах, на нашу думку, завдяки використанню відповідних препаратів для лікування інфікованих опіків.

Відомо, що на тлі системного запального синдрому, що розвивається під впливом опікової інфекції, спостерігаються зниження антиоксидантної активності плазми крові та розвиток вираженого внутрішньосудинного окислювального стресу. На 7-му, 14-ту та 21-шу добу загальна антиоксидантна активність сироватки крові була знижена в 1,3 рази в групі тварин, яких не лікували, а також в 1,2 рази в 3-й та 5-й групах тварин, яких лікували чистим сорбентом і сорбентом з сульфаметоксазолом порівняно з показниками тварин 1-ї групи. Такі результати можуть вказувати на більш виражене порушення балансу системи прооксиданти–антиоксиданти у вказаних групах. У 4-й та 6-й групах відзначали зниження загальної антиоксидантної активності сироватки крові на 7-му добу в 1,1 рази, а вже на 14-ту добу лікування показники достовірно не відрізнялися від таких у тварин 1-ї групи ($p < 0,05$). До 21-ї доби рівень загальної антиоксидантної активності сироватки крові у вказаних групах перевищував контрольні показники в 1,4 рази. На нашу думку, це може свідчити про підвищення фермен-

Таблиця 1. ТБК-активні продукти ПОЛ у експериментальних тварин на тлі лікування гострої опікової інфекції, ($M \pm m$) мкмоль/л

Група	7-й день	14-й день	21-й день	Δ7-й–14-й день		Δ7-й–21-й день	
				абс. ч.	%	абс. ч.	%
1-ша	2,28±0,06						
2-га	6,97±0,23	4,59±0,10	2,74±0,36	2,38±0,30	34,00±2,70	4,23±0,40	60,70±5,10
3-тя	6,30±0,07	5,13±0,17	2,40±0,07	2,38±0,30	18,66±2,30	3,88±0,10	61,60±1,10
4-та	6,06±0,17	1,16±0,10	1,36±0,06	4,90±0,20	80,80±1,80	4,70±0,20	77,60±0,90
5-та	5,70±0,11	4,58±0,12	2,64±0,11	1,16±0,10	20,20±2,20	3,11±0,20	54,00±2,70
6-та	6,05±0,07	3,26±0,06	2,19±0,09	2,79±0,10	46,00±1,50	3,86±0,10	63,78±1,40

Примітка. $p < 0,001$.

тативної ланки антиоксидантної системи у мишей на тлі лікування сорбентом з левофлоксацином та маззю з 1%-вим сульфадіазиним срібла, також можна припустити, що вказані препарати пригнічують розвиток шкідливого для тварин процесу окиснення (табл. 2).

зниження рівня церулоплазміну ($p < 0,001$) у порівнянні з попереднім терміном спостереження, та показник майже дорівнював значенням тварин контрольної групи. У тварин 3-ї та 6-ї груп відзначали зниження рівня церулоплазміну, але все одно він перевищував

Таблиця 2. Загальна антиоксидантна активність у експериментальних тварин на тлі лікування гострої опікової інфекції в динаміці, ($M \pm m$) ммоль/л

Група	7-й день	14-й день	21-й день
1-ша	1,60±0,20		
2-га	1,24±0,20	1,25±0,10	1,21±0,10
3-тя	1,32±0,10	1,35±0,10**	1,27±0,10
4-та	1,44±0,10***	1,58±0,10***	2,30±0,60***
5-та	1,22±0,10	1,35±0,20***	1,27±0,10**
6-та	1,42±0,10***	1,60±0,10***	2,17±0,70***

Примітка. $p < 0,01$; * достовірно в порівнянні з попереднім днем; ** в порівнянні з 2-ю групою (без лікування).

Отримані нами результати співпадають з даними вітчизняних авторів [6], які також засвідчують подібні зміни в системі ЗАА мишей на тлі розвитку генералізованої синьогнійної інфекції. На нашу думку, це може бути одним з ефективних критеріїв контролю перебігу захворювання, у розвитку якого істотна роль належить процесам ПОЛ, підбору індивідуальної медикаментозної терапії та оцінці ефективності лікування в клінічній практиці.

Визначення гострофазових показників запалення було наступним етапом дослідження. Відомо, що церулоплазмін має ферментативну активність і відіграє роль антиоксиданту. При опіковій травмі протеоліз, індукований інтерлейкіном-1, стимулює синтез білків гострої фази печінки. У нашому експерименті на 7-му добу рівні сироваткового церулоплазміну були підвищені в усіх групах тварин, а саме в 2-й та 4-й – в 1,6 раза, в 3-й, 5-й та 6-й – в 1,7. На 14-ту добу у тварин 2-ї групи показник був вищим за контрольні значення в 1,3 раза, а у тварин 4-ї та 5-ї груп відбулося достовірне

рівень у контролі в 1,2 раза ($p < 0,05$). До 21-ї доби найнижчий рівень церулоплазміну відзначався у тварин 5-ї та 6-ї груп, у тварин 4-ї групи залишався на рівні контрольних значень, у тварин 2-ї та 3-ї груп був найвищим (рис. 1).

Наші дані співпадають з даними інших авторів, які також зазначають, що рівні білка церулоплазміну в плазмі пацієнтів з опіками та іншими травмами були схожими з такими у групі контролю під час надходження до лікарні і залишалися приблизно однаковими або злегка збільшувалися після 5-ї доби [7]. Можна зробити висновок, що швидкість збільшення рівня церулоплазміну в сироватці крові сповільнюється під час застосування експериментального аплікаційного сорбенту з левофлоксацином та мазі з сульфадіазиним срібла.

Наступним параметром, який визначали, був рівень гаптоглобіну. На 7-му добу спостерігалось його підвищення в усіх групах піддослідних тварин, а саме в 4-й, 5-й та 6-й

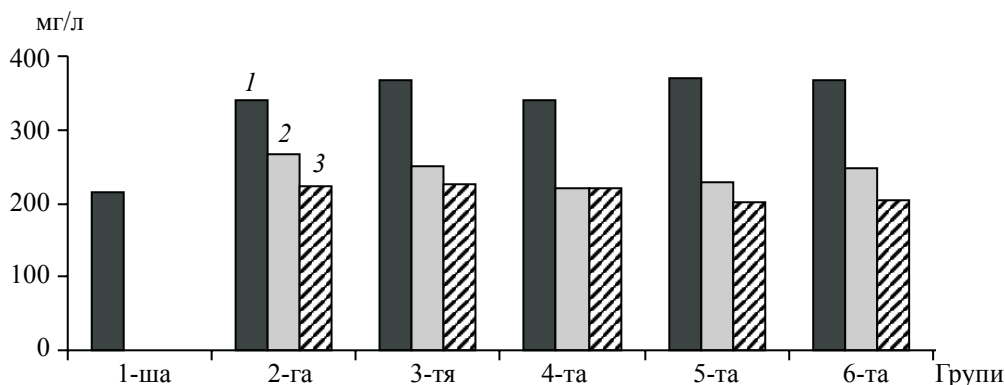


Рис. 1. Рівень церулоплазміну на 7-му (1), 14-ту (2) та 21-шу (3) добу

групах у 2,8 раза, у 2-й в 2,6 та в 3-й у 2 рази відповідно. Протягом 14-ї доби цей показник залишався високим у 2-й, 3-й та 5-й групах, у тварин 4-ї та 6-ї груп спостерігали нормалізацію та дещо знижені цифри гаптоглобіну. До 21-ї доби показник у всіх групах дорівнював такому у тварин 1-ї групи (рис. 2). Більш швидка нормалізація цього параметра в 4-й та 6-й піддослідних групах може свідчити про прискорення зменшення місцевого запалення та інтоксикації, що сприяє більш ранньому початку процесу репарації в рані.

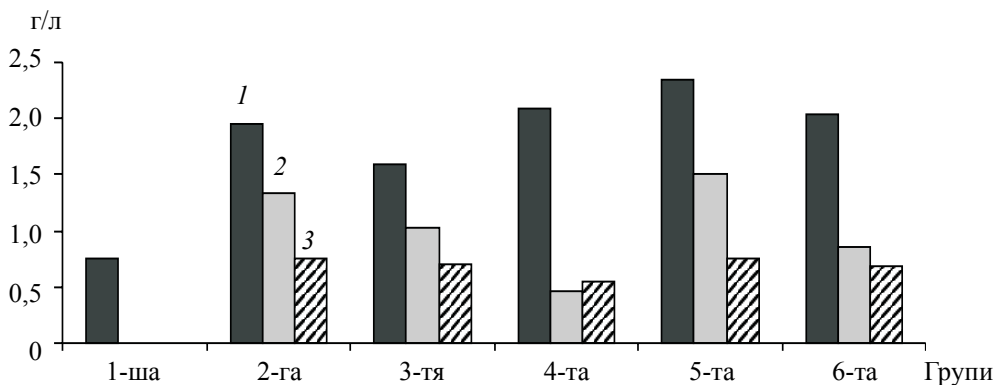


Рис. 2. Рівень гаптоглобіну на 7-му (1), 14-ту (2) та 21-шу (3) добу

Наступним етапом було визначення рівня серомукоїдів у сироватці крові. Це сироваткові глікопротеїни, які виходять у кровоносне русло зі сполучної тканини, якщо остання піддається механічному впливу чи руйнуванню. Отримані дані свідчать про підвищення рівня серомукоїдів у тварин усіх груп протягом всього періоду спостереження. На 7-му добу рівень серомукоїдів у тварин 2-ї, 5-ї та 6-ї груп був вищим у 3,8 раза, у 4-й – в 4,3 раза, в 3-й – у 5 разів порівняно з контрольними тваринами ($p < 0,05$). До 14-ї доби в 4-й групі показники майже дорівнювали таким в контрольній групі, в інших групах залишалися підвищеними, а саме у 2-й – в 2,5 раза, у 5-й та 6-й – в 2,

в 3-й – в 3,75 раза відповідно. До 21-ї доби значення рівня серомукоїдів дорівнювали контрольним у 4-й та 6-й групах, у 2-й та 5-й були дещо вищими (в 1,6 та 1,4 раза відповідно), у 3-й – перевищували в 2,6 раза (рис. 3).

Як відомо, підвищення рівня С-реактивного білка (СРБ) в сироватці крові свідчить, що в організмі йде гострий запальний процес. Крім високої чутливості, СРБ також добре реагує на терапевтичні заходи, тому може бути використаний для контролю за перебігом і лікуванням різних патологічних станів, які

супроводжуються підвищенням цього показника [8, 9]. Щодо отриманих результатів, то на 7-му добу у піддослідних тварин відмічено достовірно більш високі значення СРБ, ніж у інтактних тварин ($p < 0,05$), однак рівень цього показника не був значно вище. На 14-й день у тварин 4-ї та 6-ї груп спостерігали нормалізацію показників, а в інших групах рівень СРБ залишався дещо вищим, ніж у контрольних тварин. До 21-ї доби рівень СРБ у тварин усіх груп дорівнював референтним (рис. 4).

Отже, варто зауважити, що у тварин, яких лікували новим апікаційним сорбентом з левофлоксацином, спостерігали достовірно швидше зниження рівня СРБ до норми вже

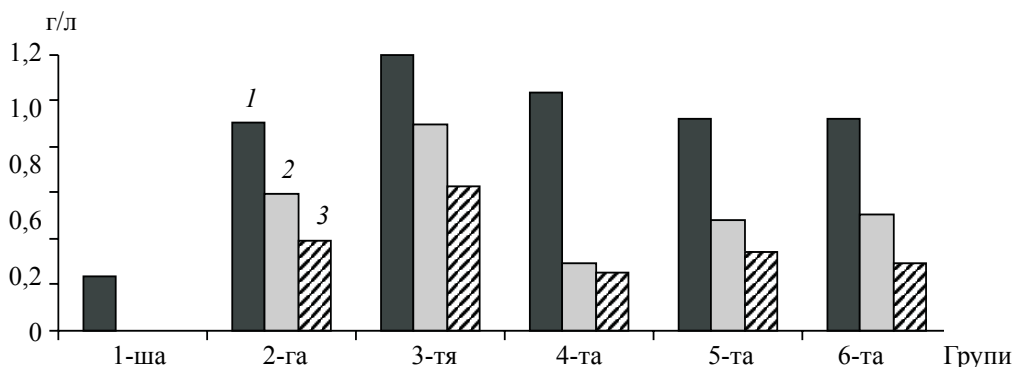


Рис. 3. Рівень серомукоїдів на 7-му (1), 14-ту (2) та 21-шу (3) добу

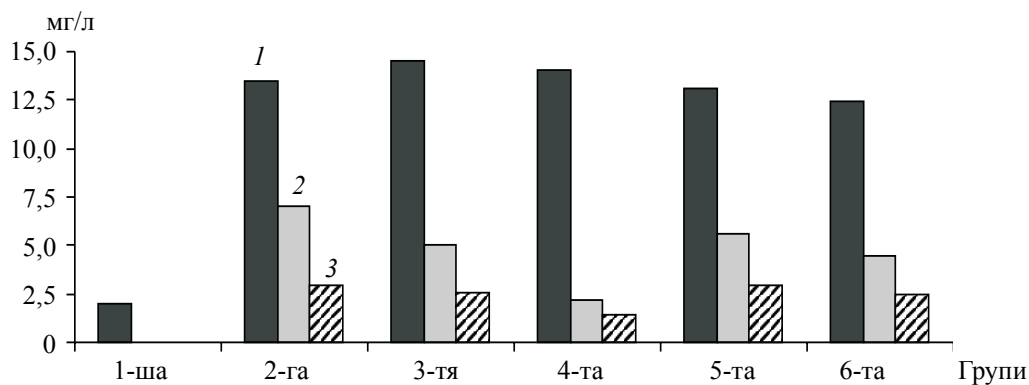


Рис. 4. Рівень СРБ на 7-му (1), 14-ту (2) та 21-шу (3) добу

на 14-ту добу лікування ($p < 0,05$). У свою чергу, тварини, які отримували сульфадіазин срібла, також показали гарні результати лікування, проте рівень СРБ до 2-го тижня знизився лише у 2,8 раза у порівнянні з 7-ю добою та був удвічі більшим за той самий показник у тварин 4-ї групи. Таким чином, можна зробити висновок, що високий рівень СРБ свідчить про початок інфекційного процесу на ранньому етапі його розвитку, а застосування дослідного сорбенту з левофлоксацином прискорює зниження його концентрації.

Список літератури

1. The pathogenesis of burn wound conversion / V. Singh, L. Devgan, S. Bhat, S.M. Milner // *Ann. Plast. Surg.* – 2007. – № 59 (1). – P. 109–115.
2. Evers L.H. The biology of burn injury / L.H. Evers, D. Bhavsar, P. Mailender // *Exp. Dermatol.* – 2010. – № 19. – P. 777–783.
3. Модифицирование поверхности углеродного сорбента поли-N-винилпирролидоном для аппликационной медицины / О.Н. Бакланова, Л.Г. Пьянова, В.П. Талзи и др. // *Физикохимия поверхности и защита материалов.* – 2012. – Т. 48, № 4. – С. 363–369.
4. Fabrication and study of biologically active organosilica polymer composites used for application sorption / E.V. Belik, A.V. Brykalov, F.A. Bostanova et al. // *Fibre Chemistry.* – 2008. – V. 40, № 5. – P. 445–446.
5. Мінухін В.В. Мікробіологічне обґрунтування розробки препаратів для профілактики і лікування синьогнійної інфекції. Дис. докт. мед. наук: 14.02.05/ В.В Мінухін. – Харків, 1997. – С. 237–257.
6. Popov M.M. Metabolic peculiarities at experimental generalized process caused by *Pseudomonas aeruginosa* (Electronic resource) / M.M. Popov, S.G. Malanchuck, M.M. Mishina // *Annals of Mechnikov Institute.* – 2017. – № 2. – P. 34–38. Mode of access: <https://www.imiamn.org.ua/journal.html>
7. Ceruloplasmin and hypoferremia: studies in burn and non-burn trauma patients (Electronic resource) / M.A. Dubick, J.L. Barr, C.L. Keen, J.L. Atkins // *Antioxidants (Basel).* – 2015. – № 4 (1). – P. 153–169. Mode of access: <https://doi.org/10.3390/antiox4010153>
8. Can we use C-reactive protein levels to predict severe infection or sepsis in severely burned patients? (Electronic resource) / M.G. Jeschke, C.C. Finnerty, G.A. Kulp et al. // *Int. J. Burn Trauma.* – 2013. – № 3 (3). – P. 137–143. Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3712409/>
9. A conformational change of C-reactive protein in burn wounds unmasks its proinflammatory properties (Electronic resource) / D. Braig, B. Kaiser, J.R. Thiele et al. // *Int. Immunology.* – 2014. – V. 26 (8). – P. 467–478. Mode of access: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu056>

References

1. Singh V., Devgan L., Bhat S., Milner S.M. (2007). The pathogenesis of burn wound conversion. *Ann. Plast. Surg.* 59 (1): 109–115.
2. Evers L.H., Bhavsar D., Mailender P. (2010). The biology of burn injury. *Exp. Dermatol.* 19: 777–783.
3. Baklanova O.N., Pyanova L.G., Talzi V.P. et al. (2012). Modifitsirovanie poverkhnosti uglerodnogo sorbenta poli-N-vinilpirrolidonom dlya aplikatsionnoy meditsiny. *Fizikokhimiya poverkhnosti i zashchita materialov.* 48, 4: 363–369 [in Russian].
4. Belik E.V., Brykalov A.V., Bostanova F.A. et al. (2008). Fabrication and study of biologically active organosilica polymer composites used for application sorption. *Fibre Chemistry.* 40, 5: 445–446.
5. Minukhin V.V. (1997). Mikrobiolohichne obgruntuvannya rozrobky preparativ dlia profilaktyky i likuvannya synohniinoi infektsii. *Dys. d-ra med. nauk:* 14.02.05. Kharkiv [in Ukrainian].
6. Popov M.M., Malanchuck S.G., Mishina M.M. (2017). Metabolic peculiarities at experimental generalized process caused by *Pseudomonas aeruginosa* (Electronic resource). *Annals of Mechnikov Institute.* 2: 34–38.
7. Dubick M.A., Barr J.L., Keen C.L., Atkins J.L. (2015). Ceruloplasmin and hypoferrremia: studies in burn and non-burn trauma patients. *4 (1):* 153–169.
8. Jeschke M.G., Finnerty C.C., Kulp G.A. et al. (2013). Can we use C-reactive protein levels to predict severe infection or sepsis in severely burned patients? *Int. J. Burn Trauma.* 3 (3): 137–143.
9. Braig D., Kaiser B., Thiele J.R. et al. (2014). A conformational change of C-reactive protein in burn wounds unmasks its proinflammatory properties. *International Immunology.* 26 (8): 467–478.

A.M. Чернякова, В.В. Минухин, Т.В. Горбач

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЫШЕЙ С ОЖОГОВОЙ PSEUDOMONAS-ИНФЕКЦИЕЙ ПРИ ЛЕЧЕНИИ НОВЫМИ АППЛИКАЦИОННЫМИ СОРБЕНТАМИ

Термическая травма непосредственно связана с биохимическими изменениями, происходящими в макроорганизме. Сравнивали уровни перекисного окисления липидов (ПОЛ), общей антиоксидантной активности и острофазовых белковых показателей сыворотки крови у животных с ожоговой *Pseudomonas*-инфекцией при лечении экспериментальными аппликационными сорбентами и мазью с сульфадиазином серебра. Было показано, что у животных, которых лечили аппликационным сорбентом с левофлоксацином, снижался уровень ПОЛ уже на 2-ю неделю и повышался уровень общей антиоксидантной активности к 3-й неделе, что указывало на положительную динамику. Нормализация уровней острофазовых белков состоялась уже на 14-е сутки. Следовательно, можно предположить, что использование аппликационного сорбента с левофлоксацином ускоряет нормализацию биохимических показателей макроорганизма и, таким образом, влияет на более раннее начало заживления инфицированной ожоговой раны в эксперименте.

Ключевые слова: ожоговая инфекция, аппликационный сорбент, перекисное окисление липидов, C-реактивный белок, острофазовые белки.

G.M. Cherniakova, V.V. Minukhin, T.V. Gorbach

COMPARATIVE STUDY OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF MICE WITH PSEUDOMONAS BURN INFECTION TREATED BY NEW APPLICATION SORBENTS

Thermal trauma is associated with biochemical changes in the macroorganism. It was compared the levels of lipid peroxidation, total antioxidant activity and acute phase protein in animals with *Pseudomonas*-infection of burn wounds during treatment with experimental application sorbents and silver sulfadiazine. It was shown that the level of levels of lipid peroxidation in animals treated with an application sorbent with levofloxacin was lowering for the second week and the level of total antioxidant activity was increased by the third week, which indicated as positive trend. Normalization of acute phase proteins levels was on the 14th day. It can be assumed that the use of the application sorbent with levofloxacin accelerates the process of normalizing the biochemical indices of the macroorganism and, thus, affects the earlier onset of healing of the infected burn wound in the experiment.

Keywords: burn infection, application sorbent, lipid peroxidation, C-reactive protein, acute phase proteins.

Надійшла 31.10.17

Контактна інформація

Чернякова Ганна Михайлівна – аспірант кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д. П. Гриньова Харківського національного медичного університету.

Адреса: Україна, 61022, м. Харків, проспект Науки, 4.

Тел.: +380934628728.

E-mail: chernyakova2222@gmail.com.

Мінухін Валерій Володимирович – доктор медичних наук, професор кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д.П. Гриньова Харківського національного медичного університету.

Горбач Тетяна Вікторівна – кандидат біологічних наук, доцент кафедри біологічної хімії Харківського національного медичного університету.