

Міністерство охорони здоров'я України  
Харківський національний медичний університет

**КРИВОШАПКА Олександр Вікторович**

УДК 616-001.4-001.17-036.12-092:612.017

**РОЛЬ ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ  
У МЕХАНІЗМАХ ХРОНІЗАЦІЇ ОПІКОВОЇ РАНИ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Харків–2012

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Харківському національному медичному університеті МОЗ України.

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, професор **Звягінцева Тетяна Володимирівна**, Харківський національний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри фармакології та медичної рецептури.

**Офіційні опоненти:**

доктор медичних наук, професор **Шевченко Олександр Миколайович**, Харківський національний медичний університет МОЗ України, професор кафедри патологічної фізіології;

доктор медичних наук, професор **Костенко Віталій Олександрович**, ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ України (м. Полтава), завідувач кафедри патологічної фізіології.

Захист відбудеться 19 квітня 2012 р. о 13.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.600.03 при Харківському національному медичному університеті (61022, м. Харків, пр. Леніна, 4).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Харківського національного медичного університету (61022, м. Харків, пр. Леніна, 4).

Автореферат розісланий «\_\_» березня 2012 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
канд. мед. наук, доцент



О.Ю. Степаненко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Проведені численні дослідження патогенезу й методів фармакологічної корекції ранового процесу, однак проблема ефективного лікування хронічних ран не вирішена (Фісталь Е.Я. та співавт., 2004; Алексашин М.Ю., 2006; Матвійчук О.Б., Зіменковський А.Б., 2009). В Україні тільки після операцій із приводу гострої абдомінальної патології й травматичного ушкодження органів черевної порожнини в 7,4 % хворих спостерігаються ускладнення у вигляді хронічних ран (Абаєв Ю.К., 2006). Особливо складно піддаються лікуванню радіоіндуковані (Звягінцева Т.В., Миронченко С.І., Желнін Є.В., 2009; Звягінцева Т.В., Халін І.В., 2011) й опікові рани (Алексеев А.А. и соавт., 2005; Руднов В.А. и соавт., 2006; Фисталь Э.Я., Солошенко В.В., 2009). Опіки мають багатовікову історію, проте увага до цього питання не послаблюється. Це пов'язано зі збільшенням частоти опіків у побуті й на виробництві, в умовах катастроф мирного часу й регіональних воєнних конфліктів, а також зі складністю патогенезу й лікування опікової хвороби, а головне – з високою летальністю (Муразян Р.І., Панченков Н.Р., 2003; Багненко С.Ф. и соавт., 2006; Ельський В.Н. и соавт., 2009). У першу чергу при опіках ушкоджується шкірний покрив. Саме його ушкодження вважають головним у розвитку опікової хвороби (Сивцова Н.Л., 1994; Андрієшин О.П., 2001).

Останнім часом основними напрямками дослідження патогенезу запалення й ранового процесу стали імунологічні й молекулярно-біологічні. На перший план вивчення вийшли цитокіни – молекули міжклітинної сигналізації. Роль цитокінів у регуляції процесів запалення стала предметом інтенсивного вивчення в усьому світі (Kataoka T., 2009; Kunz M., Ibrahim S.M., 2009). У цілому, цитокіни в низьких концентраціях необхідні для правильного формування вогнища запалення; більш високі дози викликають розвиток системних проявів запальної реакції (Abraham E., Singer M., 2007).

Вирішення проблеми ефективного лікування ран, які довго не загоюються, пов'язано з розкриттям ключових механізмів ранового процесу, серед яких важливу роль відіграють порушення міжклітинних взаємодій. Виявлено, що загоєння значною мірою залежить від характеру ранового запалення, одним з найважливіших механізмів якого є коливання рівня прозапальних цитокінів у вогнищі (Симбирцев А.С., 2002; Звягінцева Т.В. та співавт., 2007–2011). Деякі автори вважають, що відстрочене загоєння зумовлено експресією IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$  цитокінів, які утримують перебіг ранового процесу в стадії персистуючого запалення (Medzhitov R., Horng T., 2009). Іншим важливим патогенетичним механізмом розвитку хронічної рани багато авторів вважають гіпоксію у вогнищі запалення, а запорукою успішного загоєння – адекватну неоваскуляризацію. Основний регуляторний фактор ангіогенезу – IL-8.

Відомо, що опік супроводжується активацією утворення вільних радикалів кисню й оксиду азоту, з якими пов'язують формування вторинного імунодефіцитного стану (Гулу Н.М., Чумак А.А., Бердишев А.Г., 2009). Разом з тим роль оксиду азоту в механізмі розвитку опікової травми не цілком зрозуміла. Оксид азоту розглядають як важливий чинник імунологічної реактивності, точ-

ніше неспецифічного імунітету, необхідний для здійснення регуляторних цитопротекторних процесів на рівні органел клітини й усього організму (Камінська Л.Ю. та співавт., 2005; Костенко В.О. та співавт., 2008–2011), що бере участь в антимікробному захисті (Сомова Л.М., Плехова Н.Г., 2006). Недостатня продукція оксиду азоту сполучена з розвитком порушень у серцево-судинній та інших системах організму. Крім того, надлишкова продукція оксиду азоту активує процеси перекисного окиснення ліпідів, інші механізми тканинного ушкодження (Hauck J.W., Ralston D.R., Morris B., 1997; Костенко В.О. та співавт., 2008–2011).

Під впливом оксиду азоту окиснюються тіоли з утворенням нітрозотіолів (Ванін А.Ф., 1998; Mallis R.J., Buss J.E., Thomas J.A., 2001), що позначається на вмісті SH-груп. Крім того, визначення SH-груп при опіках може мати й прогностичну цінність – відомі факти про їх використання як прогностичного критерію при променевих ушкодженнях шкіри (Звягінцева Т.В., 2001), для діагностики й оцінювання активності захворювань ЦНС (Солопов В.Н., Резников І.І., Чучалин А.Г., 1988; Calahre W.K. et al., 2000). Залишається відкритим питання про роль прозапальних цитокінів, оксиду азоту й SH-груп у патогенезі опікової рани, схильної до хронізації.

Таким чином, розкриття ключових механізмів переходу гострої рани в хронічну має актуальне медичне й соціальне завдання. Можна сподіватися, що з'ясування значення прозапальних цитокінів у розвитку опікової рани, особливостей запально-репаративних явищ буде сприяти його вирішенню.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Харківського національного медичного університету МОЗ України «Міжклітинні взаємодії в патогенезі запалення: взаємодія еозинофілів і тканинних базофілів» (номер державної реєстрації 0109U001742), «Створення, дослідження й патогенетичне обґрунтування застосування нових комбінованих лікарських засобів і лікарських засобів політропної дії» (номер державної реєстрації 0109U001748). Здобувач є співвиконавцем теми.

**Мета і завдання дослідження.** Мета дослідження – на підставі експериментальних досліджень з'ясувати роль прозапальних цитокінів у механізмах хронізації опікової рани.

Завдання дослідження.

1. Визначити рівень прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 у периферичній крові в динаміці розвитку опікової рани.

2. Вивчити кількість клітин-продуцентів IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 у вогнищі в процесі розвитку опікової рани.

3. Вивчити вплив ранозагоюючих лікарських засобів з різними механізмами дії: анаболічним – мазь «Метилурацилова», антиоксидантним – «Мазь тіотриазоліну 2 %» на рівень прозапальних цитокінів у периферичній крові за умов термічного опіку.

4. З'ясувати вплив мазі «Метилурацилова» і «Мазі тіотриазоліну 2 %» на клітини-продуценти прозапальних цитокінів у вогнищі в процесі розвитку опікової рани.

5. Визначити рівень метаболітів оксиду азоту й SH-груп у вогнищі й периферичній крові в динаміці розвитку опікової рани й під впливом ранозагоюючих лікарських засобів з різними механізмами дії.

6. Вивчити морфологічні прояви загоєння в динаміці перебігу термічного опіку й під впливом ранозагоюючих лікарських засобів з різними механізмами дії.

7. З'ясувати можливий взаємозв'язок між прозапальними цитокінами, метаболітами оксиду азоту, SH-групами й перебігом термічного опіку.

*Об'єкт дослідження* – патогенез термічного опіку.

*Предмет дослідження* – прозапальні цитокіни в механізмах хронізації опікової рани.

*Методи дослідження*: патофізіологічні, біохімічні, морфологічні, статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше за умов експерименту доведено, що прозапальні цитокіни IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  і IL-8 впливають на перебіг і результат запально-репаративних процесів опікової рани. Показано, що розвиток опікової рани характеризується вираженим і тривалим, у порівнянні зі звичайною гострою раною, підвищенням вмісту маркерних прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  і IL-8 у крові й супроводжується порушенням репаративної регенерації, уповільненням загоєння. Доказом участі прозапальних цитокінів у механізмах хронізації опікової рани є дані, отримані в результаті застосування ранозагоюючих лікарських засобів – мазі «Метилурацилова» і «Мазі тіотриазоліну 2 %». Їхнє застосування скорочує період цитокінової активності в крові, що супроводжується прискоренням процесів загоєння, обмеженням деструктивних змін у шкірі, інтенсифікацією утворення грануляційної тканини, її дозрівання, епітелізації.

Уперше проведено дослідження клітин-продуцентів прозапальних цитокінів (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8) дозволило одержати нові дані, що свідчать про різке зменшення кількості клітин і їхнє повільне відновлення у вогнищі термічного ушкодження, а також про цитопротекторну дію ранозагоюючих мазей, що підтверджується меншим спадом і прискореним відновленням клітин-продуцентів прозапальних цитокінів у вогнищі.

Доведено взаємозв'язок між прозапальними цитокінами й метаболітами оксиду азоту й сульфгідрильними групами в периферичній крові й вогнищі.

Отримано дані про нові механізми дії ранозагоюючих препаратів мазь «Метилурацилова» і «Мазь тіотриазоліну 2 %» – їхню здатність модулювати цитокінові механізми запалення й репарації.

**Практичне значення одержаних результатів.** Робота належить до фундаментальних досліджень, що розширює уявлення про механізми хронізації ранового процесу на прикладі опікової рани. Разом з тим отримані результати мають також певне прикладне значення. Зокрема, проведені експериментальні

дослідження показали доцільність застосування препаратів мазь «Метилурацилова», а особливо «Мазь тіотриазоліну 2 %», для лікування ран, які довго не загоюються та супроводжуються порушенням функціонування прозапальної цитокінової системи.

Враховуючи той факт, що кінетика цитокінових показників у периферичній крові більш виражена, ніж у вогнищі, визначення прозапальних цитокінів у периферичній крові є не тільки більш зручним, а й більш інформативним і надійним критерієм оцінки загоєння й хронізації процесу.

За результатами дослідження отримано 1 патент України (№ 54891) «Пристрій для моделювання термічних опіків». Обладнання може використовуватися для моделювання опіків різного ступеня й площі.

Результати роботи можуть бути використані в подальшій науково-дослідній роботі й у викладанні патологічної фізіології та інших медичних дисциплін.

Результати дослідження впроваджені в навчальний процес кафедр патологічної фізіології і фармакології Національного фармацевтичного університету (м. Харків), кафедри патологічної фізіології Донецького національного медичного університету ім. М. Горького, кафедри фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Сумського державного університету, кафедри патологічної фізіології Харківського національного медичного університету.

**Особистий внесок здобувача.** Автором проведено патентно-інформаційний пошук, проаналізовано наукову літературу за темою дисертації, спільно з керівником визначено мету і завдання дослідження, самостійно відтворені моделі, особисто виконані всі серії експериментальних досліджень. Морфологічні й імуноморфологічні дослідження виконано на базі кафедри патоморфології ХНМУ (завідувач кафедри – д-р мед. наук, проф. В.Д. Марковський), співробітникам якої автор дуже вдячний.

**Апробація результатів дослідження.** Матеріали дослідження доповідалися й обговорювалися на міжвузівській конференції молодих вчених і студентів «Медицина третього тисячоліття» (Харків, 2009), XVII Російському національному конгресі «Человек и лекарство» (Москва, 2010), VI міжнародному конгресі патофізіологів (Монреаль, Канада, 2010), науковій міжнародній конференції «Наука и образование в современной России» (Москва, 2010), XVIII Російському національному конгресі «Человек и лекарство» (Москва, 2011), III Загальноросійській студентській електронній науковій конференції «Студентський науковий форум 2011», науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання клінічної та експериментальної фармакології» (Київ, 2011), XVII міжміській конференції молодих вчених «Актуальні проблеми патофізіології» (Санкт-Петербург, 2011), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми онкоморфології» (Харків, 2011), IV міжнародному науковому міждисциплінарному конгресі студентів-медиків і молодих вчених (ISIC) (Харків, 2011).

**Публікації.** За матеріалами дослідження опубліковано 15 наукових праць, у тому числі 4 статті в наукових фахових виданнях, а також 10 тез у ма-

теріалах конгресів, з'їздів, конференцій, отримано 1 деклараційний патент України.

**Структура та обсяг дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи викладено на 150 сторінках друкованого тексту. Робота містить такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали й методи дослідження, 5 розділів результатів власних досліджень, аналіз і узагальнення результатів дослідження, висновки, список літератури, який містить 181 джерел: 65 робіт вітчизняних авторів і 116 – іноземних. Дисертаційну роботу ілюстровано 36 рисунками й 22 таблицями, які займають 1 повну сторінку.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали і методи.** Дослідження виконані на 120 статевозрілих щурах популяції WAG масою 200–250 г. Усі процедури з тваринами, а також виведення тварин з експерименту проводили відповідно до національних «Загальних етичних принципів дослідів на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18.03.86), Гельсінською декларацією, прийнятою Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (1964–2000 рр.), Статутом Української асоціації з біоетики й нормами GCP (1992 р.), відповідно до вимог та норм ICH GLP (2002 р.), типових положень з питань етики МОЗ України № 66 від 13.02.03 р. (протокол засідання комісії з біоетики № 3 від 2.03.2011 р.). Використовували мінімально припустиму для статистичної обробки й одержання достовірних результатів загальноприйняту кількість тварин (по 6 на групу та термін), а також мінімально достатню для досягнення мети й вирішення завдань дослідження кількість експериментальних груп, тобто загальну кількість тварин.

Тварин було розподілено на 4 групи: I – інтактні тварини, II – лабораторні тварини з термічним опіком, III – лабораторні тварини з термічним опіком, на ділянку опіку наносили метилурацилову мазь, IV – лабораторні тварини з термічним опіком, на ділянку опіку наносили мазь тіотриазоліну.

Термічний опік ділянки спини щурів площею 400 мм<sup>2</sup> моделювали під барбаміловим наркозом приладом із встановленою температурною шкалою й електропаяльником, на кінці якого кріпиться металева насадка (Яковлева Л.В., Кальф-Каліф З.С., Ткачова О.В., 1999). За допомогою даного приладу викликали термічний опік III В ступеня.

З метою вивчення впливу ранозагоюючих лікарських засобів на рівень прозапальних цитокінів застосовували препарати «Метилурацилова 10 % мазь» (ВАТ «Нижфарм», Російська Федерація) і «Мазь тіотриазоліну 2 %» (ВАТ «Хімфармзавод «Червона зірка», Україна). Метилурацилову мазь і мазь тіотриазоліну наносили тонким шаром на пошкоджену поверхню відразу після термічного впливу й протягом усього періоду експерименту (28 діб). Тварин виводили з експерименту на 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу й 28-му добу.

Вміст цитокінів IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  і IL-8 у периферичній крові визначали імуноферментним методом на імуноферментному аналізаторі «Labline-90» (Авст-

рія) відповідно до інструкції, яка додається до приладу. Імуногістохімічні дослідження клітин-продуцентів IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  і IL-8 проводили на парафінових зрізах, прямим методом Кунса за методикою Brosnan (1979). Препарати вивчали в люмінесцентному мікроскопі «Axioskop 40» з використанням програмного забезпечення Biostat.exe. За допомогою окулярних сіток визначали кількість клітин-продуцентів інтерлейкінів у полі зору  $\times 400$ , потім підраховували відносну кількість цих клітин. Використовували моноклональні антитіла щурів фірми Serotec.

Для з'ясування морфологічних особливостей тканини (шкіра, підшкірна клітковина, м'язи), зрізи після відповідної обробки забарвлювали. Забарвлення гематоксиліном та еозином використовувалося для загальної оцінки стану досліджуваних тканин. Забарвлення препаратів фукселіном на еластичні волокна за Вейгертом з дозбарвленням пікрофуксином за ван Гізон використовувалося для виявлення й диференціювання сполучнотканинних структур. За допомогою ШИК-реакції за Мак-Манусом–Хочкісом (контроль із амілазою) виявляли нейтральні глікозаміноглікани. Гістологічні й гістохімічні методики виконувалися за приписами, викладеними у керівництвах з гістологічної техніки й гістохімії (Лилли Р., 1960; Пирс Э., 1962).

Вміст сумарних метаболітів оксиду азоту в сироватці крові й тканинах визначали за методом Green L.C. зі співавт. у модифікації Метельської В.А. і Гуманової Н.Г. (2005). Визначення SH-груп у сироватці крові й тканинах проводили за методом, який ґрунтується на застосуванні в реакції тіосульфідного обміну специфічного тіолового реагенту – 5,5 дитіобіснітробензойної кислоти (ДТНБ – реактив Еллмана) (Северин С.Е., Соловьева Т.А., 1989).

Результати досліджень обробляли методом варіаційної статистики (обчислювали середнє арифметичне і його стандартну похибку) на персональному комп'ютері з використанням програмного пакета «Stadia 6.0». Для одержання статистичних висновків застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA, критерій Крускала–Уолліса), при порівнянні вибірок – методи множинних порівнянь (критерій Ньюмена–Кейлса) і критерій Манна–Уїтні.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Перший етап роботи був присвячений дослідженню вмісту прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  й IL-8 в крові щурів в динаміці розвитку опікової рани (рис. 1). Виявлено, що вміст IL-1 $\beta$  у крові тварин збільшувався протягом перших трьох тижнів спостереження в порівнянні з показником інтактних щурів, з максимумом на 14-ту добу. Так, на 3-тю добу рівень IL-1 $\beta$  був підвищений на 31 %, на 7-му – на 70 %, на 14-ту – на 150 %, на 21-шу – на 48 % у порівнянні з таким у інтактних тварин.

Дослідження рівня TNF- $\alpha$  у крові тварин з термічним опіком показало його підвищення протягом усього часу дослідження. На 3-тю й 7-му добу вміст TNF- $\alpha$  зростав у 2,1 і 2,3 разу відповідно відносно показника інтактних тварин, досягаючи максимальних значень. Упродовж наступних трьох тижнів спостереження концентрація TNF- $\alpha$  поступово знижувалася в порівнянні з такою у попередні строки, але була вищою, ніж в інтактних щурів. На 14-ту добу рівень

TNF- $\alpha$  перевищував на 80 %, на 21-шу добу – на 46 %, на 28-му добу – на 41 % аналогічний показник інтактних тварин.

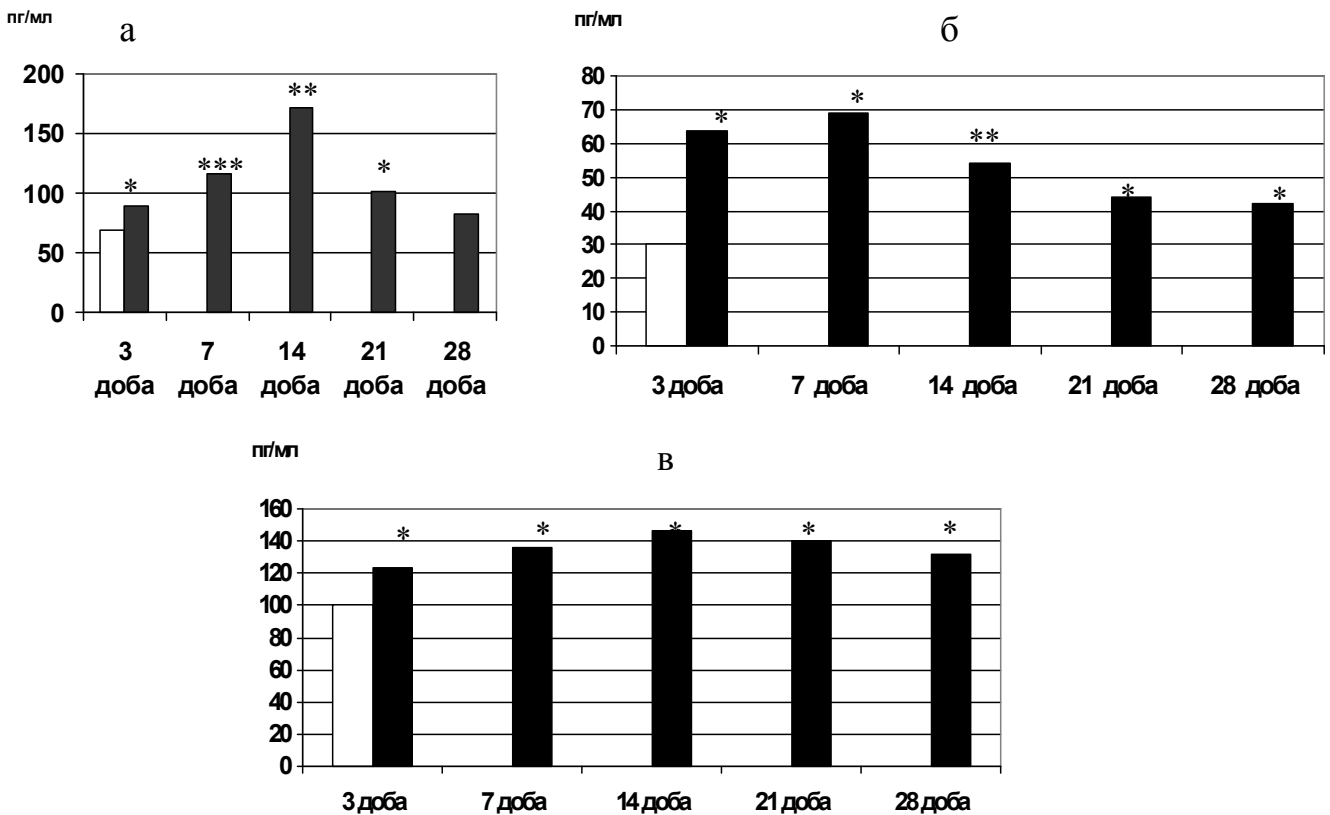


Рис. 1. Вміст IL-1 $\beta$  (а), TNF- $\alpha$  (б) і IL-8 (в) у сироватці крові щурів у динаміці розвитку опікової рани:

□ – інтактні; ■ – опік;

вірогідність розбіжностей у порівнянні з показником інтактних тварин  
\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Вміст IL-8 протягом усіх строків спостереження був вищим, ніж в інтактних тварин. На 3-тю добу рівень IL-8 збільшувався на 23 %, на 7-му добу – на 35 % у порівнянні з показником інтактних тварин. На 14-ту добу його концентрація так само, як і концентрація IL-1 $\beta$ , досягала пікових значень, перевищуючи норму в 1,5 разу, і залишалася високою до кінця спостереження. На 21-шу й 28-му добу рівень IL-8 перевищував аналогічний показник інтактних тварин на 39 і 31 % відповідно.

Необхідно зазначити, що розвиток неускладненої рани супроводжується короткочасним підвищенням рівня прозапальних цитокінів протягом запальної фази загоєння – 3–5 днів (Звягінцева Т.В., Халін І.В., 2008–2011). Розвиток опікової рани, як показали наші дослідження, супроводжується значним і тривалим збільшенням рівня прозапальних цитокінів: IL-1 $\beta$  протягом 3 тижнів спостереження, а TNF- $\alpha$  і IL-8 протягом усього часу спостереження (28 діб). Це, очевидно, є важливим механізмом, що утримує опікову рану в стані персистуючого запалення й перешкоджає нормальному загоєнню.

Для підтвердження ролі прозапальних цитокінів у затримці загоєння опікової рани досліджували їхній вміст у крові при лікуванні 2 мазевими препаратами, які показані при опіках, з різними механізмами дії: анаболічним – мазь «Метилурацилова» й антиоксидантним – «Мазь тіотриазоліну 2 %».

Застосування метилурацилової мазі викликало більш швидке зниження рівня ІЛ-1 $\beta$  у крові у порівнянні з показником у групі з опіком без лікування. Концентрація цитокіну була підвищеною відносно показника інтактних тварин лише протягом першого тижня експерименту (на 3-тю добу – на 32 %, на 7-му добу – на 37 %). До 14-ї доби цей показник знижувався до норми й був у 2,5 разу нижчим, ніж у групі з опіком. На 21-шу добу кількість ІЛ-1 $\beta$  у крові також була достовірно нижчою (в 1,3 разу), ніж у групі з опіком без застосування лікарських засобів.

Зміни вмісту ІЛ-1 $\beta$  у крові у тварин із застосуванням мазі тіотриазоліну за своєю спрямованістю були аналогічними спостережуваним у групі з застосуванням метилурацилової мазі – підвищення протягом першого тижня (на 3-тю добу – на 38 %, на 7-му добу – на 29 %) відносно показника інтактних тварин з наступним зниженням до норми протягом 14–28-ї доби. Концентрація цитокіну протягом 7–28-ї доби у крові була вірогідно нижчою, ніж у групі з опіком без застосування препаратів.

Застосування метилурацилової мазі спричинювало зниження рівня TNF- $\alpha$  у крові до норми на 21-шу й 28-му добу. У ранній термін (3-тя–14-та доба) вміст TNF- $\alpha$  у сироватці крові тварин був достовірно вищим, ніж показники інтактних щурів (на 3-тю добу – в 1,6 разу, на 7-му – в 1,4 разу, на 14-ту – в 1,3 разу), але залишався при цьому нижчим, ніж у групі з опіком без лікування.

Застосування мазі тіотриазоліну так само, як і метилурацилової, спричинювало зниження вмісту TNF- $\alpha$  до норми на 21-шу й 28-му добу. У ранній термін (3-тя–14-та доба) вміст TNF- $\alpha$  у сироватці крові тварин цієї групи був достовірно вищим за показники інтактних щурів, але нижчим, ніж у групі з опіком без лікування (на 3-тю добу – на 70 %, на 7-му – на 43 %, на 14-ту – на 16 %).

Під дією метилурацилової мазі вміст ІЛ-8 у крові знижувався до норми до 14-ї доби і залишався таким до кінця спостереження. При цьому протягом 7–28-ї доби концентрація ІЛ-8 була вірогідно нижчою, ніж у групі з опіком без застосування препаратів (на 7-му – в 1,2 разу, на 14-ту й 21-шу – в 1,6 разу, на 28-му добу – в 1,5 разу).

Застосування мазі тіотриазоліну так само, як і метилурацилової, спричинювало зниження вмісту хемокіну до рівня інтактних тварин до 14-ї доби. Надалі показник змінювався в межах фізіологічних коливань. Протягом 7–28-ї доби концентрація ІЛ-8 була вірогідно нижчою, ніж у групі з опіком без лікування (на 7-му – в 1,3 разу, на 14-ту – в 1,4 разу, на 21-шу – в 1,5 разу, на 28-му добу – в 1,3 разу).

Таким чином, застосування лікарських засобів з різним механізмом ранозагоюючого ефекту спричинює однотипні зміни цитокінового профілю крові, а саме: більш швидке зниження до норми концентрації всіх досліджених цитокі-

нів, ніж при мимовільному розвитку опікової рани. Так, вміст IL-1 $\beta$  і IL-8 нормалізується до 14-ї доби, TNF- $\alpha$  – до 21-ї доби при лікуванні мазевими препаратами, у той час як без них вміст IL-1 $\beta$  підвищений протягом 3 тижнів, а вміст інших цитокінів – протягом усього часу спостереження за опіковою раною.

На наступному етапі роботи ми провели імуногістохімічне вивчення клітин-продуцентів маркерних прозапальних цитокінів у вогнищі термічного опіку.

Дослідження клітин-продуцентів IL-1 $\beta$  у шкірі тварин з термічним опіком показало первинне зменшення їх кількості з поступовим відновленням у вогнищі до 14-ї доби (таблиця). Так, на 3-тю добу кількість клітин-продуцентів IL-1 $\beta$  у групі з опіком була достовірно нижчою за такий самий показник в інтактних тварин у 5,2 разу, на 7-му добу – в 1,4 разу. Впродовж подальшого терміну рівень клітин-продуцентів наближався до такого показника в інтактних щурів.

Таблиця

**Відносна кількість клітин-продуцентів інтерлейкінів у шкірі щурів з термічним опіком у полі зору  $\times 400$  (у перерахунку на 100 клітин)**

Група тварин	Термін, доба	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	IL-8
Інтактні		2,6 $\pm$ 0,22	2,4 $\pm$ 0,21	1,90 $\pm$ 0,30
Опік	3-тя	0,50 $\pm$ 0,01***	0,40 $\pm$ 0,01***	0,20 $\pm$ 0,03***
	7-ма	1,90 $\pm$ 0,02**	1,80 $\pm$ 0,03**	1,60 $\pm$ 0,04
	14-та	2,50 $\pm$ 0,04	2,70 $\pm$ 0,09	1,30 $\pm$ 0,05
	21-ша	2,30 $\pm$ 0,02	2,50 $\pm$ 0,03	2,60 $\pm$ 0,03*
	28-ма	2,20 $\pm$ 0,02	2,30 $\pm$ 0,03	2,50 $\pm$ 0,03

Примітка. Вірогідність розбіжностей у порівнянні з показником інтактних тварин: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Кількість клітин-продуцентів TNF- $\alpha$  у шкірі тварин з термічним опіком на 3-тю добу була достовірно нижчою за такий показник в інтактних тварин (у 6 разів). На 7-му добу кількість досліджуваних клітин збільшилася і залишалась вірогідно меншою за показники інтактних щурів. На 14-ту добу вміст клітин-продуцентів TNF- $\alpha$  так само, як і клітин-продуцентів IL-1 $\beta$ , був максимальним, вірогідно не відрізняючись від норми. Надалі рівень досліджуваних клітин перебував у межах фізіологічних коливань.

Кількість клітин-продуцентів IL-8 у шкірі тварин з термічним опіком на 3-тю добу була нижче, ніж такий самий показник в інтактних тварин у 9,5 разу, на 7-му та 14-ту добу вміст клітин підвищувався у порівнянні з показником на 3-тю добу та досягав показників інтактних тварин. На 21-шу добу вміст досліджуваних клітин досягав максимальних значень, перевищуючи показник інтактних тварин у 1,4 разу.

Таким чином, після нанесення термічного ушкодження кількість клітин-продуцентів усіх цитокінів є мінімальною та відновлюється дуже повільно. При цьому лише на 14-ту добу кількість клітин-продуцентів IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$  не відрізня-

няється від норми. Кількість клітин-продуцентів ІЛ-8 відновлюється на цей термін і продовжує зростати до кінця експерименту.

Є свідчення, що високий рівень ІЛ-8 порушує загоєння рани. Клінічні дані підтверджують, що рівень цього хемокіну був вірогідно підвищений при опіковій рані, яка довго не загоювалася, у порівнянні з показником при звичайному загоєнні рани шкіри (Yeh F.L., Lin W.L., Shen H.D., Fang R.H., 1999). *In vitro* продемонстровано інгібувальний ефект ІЛ-8 на проліферацію кератиноцитів і фібробластів, на підставі чого зроблено висновок про інгібувальний вплив ІЛ-8 на процес загоєння рани. За іншими даними, відмічено стимулюючий ефект ІЛ-8 на проліферацію кератиноцитів *in vitro*. Крім того, місцеве застосування цього хемокіну в людини стимулювало реепітелізацію в результаті збільшеної проліферації кератиноцитів (Rennekampff H.O., Hansbrough J.F., Kiessig V., Dore C., 2000). Наші дослідження ІЛ-8 при експериментальній опіковій рані свідчать на користь впливу ІЛ-8 на хронізацію ранового процесу.

Застосування метилурацилової мазі приводило до більш швидкого підвищення кількості клітин-продуцентів ІЛ-1 $\beta$  у вогнищі, ніж у тварин з мимовільним загоєнням. Так, на 3-тю добу кількість клітин-продуцентів ІЛ-1 $\beta$  була достовірно вищою за показники групи тварин з мимовільним загоєнням (в 1,6 разу), але нижчою, ніж показники в інтактній групі (в 3,3 разу). На 7-му добу кількість клітин-продуцентів збільшилася і не відрізнялася від норми, залишаючись вищою за показники нелікованих тварин (в 1,3 разу). На 14-ту добу вміст досліджуваних клітин був достовірно вищим, ніж показники групи з природним перебігом патологічного процесу (в 1,2 разу), і досягав максимуму. Надалі кількість клітин-продуцентів ІЛ-1 $\beta$  залишалася вищою за показники групи тварин з мимовільним загоєнням. Таким чином, кількість клітин-продуцентів ІЛ-1 $\beta$  при лікуванні метилурациловою маззю відновлювалася до норми починаючи з 7-ї доби.

Застосування мазі тіотриазоліну так само, як і метилурацилової мазі, приводило до більш швидкого зростання кількості клітин-продуцентів ІЛ-1 $\beta$  у вогнищі, ніж у нелікованих тварин, з максимумом на 14-ту добу.

Привертає увагу той факт, що вже на 7-му добу кількість клітин досягає норми, а на 21-шу добу вірогідно перевищує показники не тільки групи тварин з мимовільним загоєнням, а й інтактних. Отже, під впливом мазі тіотриазоліну кількість клітин-продуцентів ІЛ-1 $\beta$  відновлюється найбільш інтенсивно.

Застосування метилурацилової мазі приводило до більш швидкого збільшення кількості клітин-продуцентів TNF- $\alpha$  у вогнищі, ніж у тварин без лікування. Так, у вогнищі на 3-тю добу кількість клітин була достовірно вищою за показники групи тварин з мимовільним загоєнням (в 1,8 разу), але нижчою, ніж відповідний показник в інтактній групі. На 7-му добу кількість клітин досягала фізіологічних значень і значно перевищила показники групи тварин з мимовільним загоєнням. На 28-му добу кількість клітин-продуцентів TNF- $\alpha$  перебувала в межах нормальних показників.

Застосування мазі тіотриазоліну, як і метилурацилової мазі, спричинювало більш швидке зростання кількості клітин-продуцентів TNF- $\alpha$  у вогнищі, ніж

у тварин з мимовільним загоєнням, яке досягало максимуму на 14-ту добу. Кінетика показників подібна до такої під впливом метилурацилової мазі з тією лише особливістю, що під впливом тіотриазоліну процес відновлення клітин-продуцентів TNF- $\alpha$ , як і клітин-продуцентів IL-1 $\beta$ , має більш інтенсивний перебіг.

Застосування метилурацилової мазі також спричинювало більш швидке зростання кількості клітин-продуцентів IL-8 у вогнищі, ніж у тварин без лікування. Так, у вогнищі на 3-тю добу кількість клітин-продуцентів IL-8 була достовірно вищою за показники в групі тварин з мимовільним загоєнням (у 2,5 разу), але нижчою за такий самий показник в інтактній групі (у 3,8 разу). На 7-му добу кількість клітин-продуцентів відновлювалася, перевищуючи показники групи тварин з мимовільним загоєнням (в 1,3 разу). На 14-ту добу збільшення вмісту досліджуваних клітин було ще значнішим: показники групи із природним перебігом патологічного процесу перевищували такі у інтактних тварин (у 2,5 і 1,7 разу відповідно). До 21-ї доби кількість клітин залишалася більшою, ніж в інтактній групі тварин (в 1,4 разу). До 28-ї доби кількість клітин-продуцентів IL-8 сягала максимуму –  $(3,60 \pm 0,04)$  і залишалась вищою за показники інтактної групи тварин і групи з мимовільним загоєнням.

Застосування мазі тіотриазоліну так само, як і метилурацилової мазі, спричинювало більш швидке зростання кількості клітин-продуцентів IL-8 у вогнищі, ніж у тварин без лікування. Так, уже на 3-тю добу кількість клітин-продуцентів IL-8 була достовірно вищою за показники групи тварин з мимовільним загоєнням (втричі), але нижчою за такий показник в інтактній групі (втричі). На 7-му добу кількість клітин-продуцентів відновлювалася, вірогідно перевищуючи показники групи тварин з мимовільним загоєнням (в 1,6 разу). На 14-ту добу вміст досліджуваних клітин досягав максимуму і був достовірно вищим за показники інтактної групи тварин і групи з мимовільним загоєнням (у 2 і 1,5 разу відповідно). До 21-ї доби їхня кількість залишалася вищою, ніж в інтактній групі (на 47 %) та групі тварин без лікування (на 7 %). На 28-му добу кількість клітин-продуцентів IL-8 у вогнищі вірогідно не відрізнялась від норми.

Отже, ранозагоюючі препарати з різним механізмом дії спричинюють ті самі зміни у кількості клітин-продуцентів IL-8 у вогнищі, які були відмічені з боку клітин-продуцентів двох інших прозапальних цитокінів – IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$ : швидке й значне відновлення в порівнянні з мимовільним загоєнням опікової рани. Відновлення клітин починається з 7-ї доби, досягає максимуму до 14-ї доби й поступово знижується до норми при лікуванні тіотриазоліном. При лікуванні метилурацилом до 28-ї доби спостерігається друга хвиля підвищення рівня цитокіну, що може свідчити про незавершену репарацію, уповільнення загоєння, тобто неможливість перервати хронічний процес.

Головними джерелами й мішенями прозапальних цитокінів, поряд з деякими резидентними клітинами шкіри, є нейтрофіли й макрофаги. Ключова роль прозапальних медіаторів у лейкоцитарній функції розкрита на моделях шкірних ран мишей, нокаутуваних за геном, відповідальним за той чи інший

протизапальний цитокін. Необхідно відмітити, що незважаючи на значні зміни лейкоцитарної інфільтрації у вогнищі, інтегральний результат загоєння практично не страждав, хоча на певних етапах ранового процесу було відзначено порушення того чи іншого компонента загоєння (Ishida Y., Kondo T., Kimura A. et al., 2006).

З результатів цих робіт можна зробити дуже важливий висновок. По-перше, вибивання окремого гена, відповідального за певний прозапальний цитокін, у цілісному організмі не має принципового значення, оскільки його функції беруть на себе інші прозапальні цитокіни, що впливають на загоєння. По-друге, тільки вивчення прозапальних цитокінів на реальних моделях ранового процесу в зіставленні з клітинним складом і загальною морфологією вогнища може дати відповідь на питання про роль цитокінів у патогенезі ранового процесу. Клітинний склад вогнища разом із прозапальними цитокінами також є маркером хронізації процесу. Саме тому на наступному етапі дослідження ми провели морфологічне вивчення опікової рани.

Дані мікроскопічного дослідження препаратів шкіри щурів із зони термічного опіку показують, що перебіг патологічного процесу характеризується тяжкими деструктивними змінами шкіри з ознаками ускладнення репаративного процесу, що проявляється у вигляді нерівномірного дозрівання грануляційної тканини з наявністю вогнищ запалення й вторинних стромальних некрозів та ознак порушення процесів проліферації, диференціювання й ороговіння епідермісу у вигляді його осередкової гіперплазії з явищами акантозу й гіперкератозу.

Застосування метилурацилової мазі, як правило, обмежує деструктивні зміни, викликані термічним ушкодженням, у межах епідермісу, дерми й підшкірно-жирової клітковини; сприяє формуванню грануляційної тканини, її дозріванню й епітелізації. Перебіг репаративного процесу в меншій кількості спостережень, ніж у тварин без лікування, ускладнюється появою вторинних стромальних некрозів і вогнищ запалення регенерату й тканин, що прилягають.

Репаративні процеси при використанні мазі тіотриазоліну мають більш інтенсивний перебіг, ніж при лікуванні метилурациловою маззю, що зумовлено обмеженням деструктивного процесу в межах епідермісу й дерми, відсутністю гнійно-некротичних ускладнень у процесі загоєння дефекту. Такий перебіг репаративного процесу забезпечує більш раннє виникнення й рівномірне дозрівання молоді сполучної тканини, її епітелізацію з нормалізацією процесів проліферації й диференціювання епідермоцитів.

Зіставлення даних імуногістохімічного й загальноморфологічного дослідження вогнища дозволило дійти такого висновку. Практична відсутність клітин-продуцентів прозапальних цитокінів на 3-тю добу експерименту, очевидно, зумовлена вираженими альтеративними процесами в шкірі внаслідок термічного опіку. Збільшення кількості клітин-продуцентів IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$  до норми, що відмічається на 14-ту добу експерименту, відповідає вираженому наростанню процесів проліферації й регенерації з формуванням грануляційної тканини. Як відомо, саме ці цитокіни стимулюють, зокрема, продукцію фібронектину й ко-

лагенів (Смирнов В.С. и соавт., 2000). Кількість клітин-продуцентів ІІ-8 відновлюється з 7-ї доби й досягає максимальних значень на 21-шу добу, вірогідно перевищуючи показники інтактних тварин. На 28-му добу зберігається тенденція до підвищення цих клітин, що свідчить про хронізацію процесів репарації (Mc. Arthur W. et. al., 1982; Rosenblaom J. et. al., 1983; Смирнов В.С., Фрейдлин И.С., 2000).

При застосуванні метилурацилової мазі кількість клітин-продуцентів прозапальних цитокінів початково (на 3-тю добу) була найменшою, що так само, як і в групі з опіком, пов'язано з вираженими некротичними змінами в зоні термічного опіку. Однак їхня кількість була достовірно вище ніж у групі без лікування. Таким чином, метилурацилова мазь дещо охороняє клітини-продуценти прозапальних цитокінів від руйнування. На 7-му добу кількість клітин-продуцентів ІІ-1, TNF- $\alpha$  і ІІ-8 зростає до норми, а на 14-ту добу максимально збільшується кількість клітин-продуцентів ІІ-1 і TNF- $\alpha$ , що беруть участь, як відомо, у формуванні регенерату, представленого грануляційною тканиною (Mc. Arthur W. et al., 1982; Rosenblaom J. et al., 1983; Смирнов В.С., Фрейдлин И.С., 2000). Кількість клітин-продуцентів ІІ-8 у зоні регенерату також вірогідно висока, що, можливо, пов'язано з активацією ангиогенезу, характерного для цього строку експерименту. Крім того, оскільки на 14-ту добу в частині спостережень відмічається ускладнення у вигляді гнійного запалення в грануляційній тканині, збільшення кількості клітин-продуцентів прозапальних цитокінів може бути пов'язане і з персистуючим запаленням. На 21-шу добу кількість клітин-продуцентів ІІ-1 і TNF- $\alpha$  знижується, а на 28-му добу практично відповідає показникам групи з природним перебігом патологічного процесу, тоді як кількість клітин-продуцентів ІІ-8 на 21-шу і 28-му добу продовжує зростати, досягаючи максимальних показників.

Зазначена дисфункція прозапальної місцевої цитокінової системи в зоні регенерації при застосуванні метилурацилової мазі може бути ланкою в морфогенезі порушення репаративних процесів, відмічених нами в цій серії експерименту. Можливо, метилурацилова мазь стимулює проліферацію тканинних макрофагів або міграцію моноцитів крові в зону ушкодження.

Використання мазі тіотриазоліну так само, як і метилурацилової мазі, оберігає клітини-продуценти прозапальних цитокінів від руйнування на 3-тю добу експерименту. На 7-му добу зростає кількість клітин-продуцентів усіх вивчених нами прозапальних цитокінів до норми, що відповідає початку репаративних процесів з формуванням грануляційної тканини. На 14-ту добу відмічається максимальна кількість клітин-продуцентів ІІ-1 і TNF- $\alpha$ , що стимулюють колагеноутворення, і ІІ-8, що бере участь в ангиогенезі. Саме в ці строки експерименту, за нашим даними, вже сформувалася молода грануляційна тканина. На тлі дозрівання грануляційної тканини (21-ша доба) відбувається зменшення клітин-продуцентів прозапальних цитокінів. Однак їхня кількість залишається вищою, ніж у групі без лікування, й тільки вміст клітин-продуцентів ІІ-8 не відрізняється від виявленого в групі з природним перебігом процесу. Очевидно, у ці строки експерименту прозапальні цитокіни продовжують брати участь у

процесах регенерації, а саме: IL-1 і TNF- $\alpha$  модулюють колагенопродукцію, а IL-8 регулює ангиогенез.

Таким чином, аналіз клітин-продуцентів інтерлейкінів у зоні регенерації шкіри після термічного опіку свідчить про більш сприятливий вплив мазі тіотриазоліну у порівнянні з метилурациловою маззю.

Слід зазначити, що динаміка місцевих проявів загоєння при термічному опіку без та із застосуванням лікарських засобів відповідає в цілому встановленим морфологічним і цитокіновим показникам. Так, швидкість закриття ранового дефекту відставала в групі з мимовільним перебігом опіку, некротичні зміни були вираженішими й тривалішими, грануляції мляві, часткова епітелізація до кінця спостереження. У тварин із застосуванням мазевих препаратів перебіг опікової рани був сприятливішим, рана швидше зменшувалася за площею, зменшення зони некрозу й епітелізація відбувалися швидше. Найбільш активне загоєння відбувалося під впливом мазі тіотриазоліну.

Суттєво, що кінетика цитокінових показників у периферичній крові виявляється вираженіше і з більшою амплітудою коливань, ніж у вогнищі. Це підтверджує дані про системний і стресовий характер локальних впливів і про аварійне викидання цитокінів у крові, про зв'язок місцевого (опіки) і загального (опікова хвороба). Крім загальнотеоретичного значення, з результатів досліджень можна зробити й практичний висновок: дослідження цитокінів у периферичній крові є не тільки більш зручним, а й більш інформативним і надійним критерієм для оцінювання тяжкості стану організму при опіках. Це опосередковано підтверджують також одиничні клінічні дані. Дійсно, відразу після великих глибоких опіків рівень TNF- $\alpha$  у сироватці крові підвищується, причому це підвищення в померлих хворих більше, ніж у тих, хто вижив (Nakae H. et al., 2000). Встановлено, що рівні сироваткових прозапальних цитокінів відразу після опіку значно зростають, а потім на 2–3-й тиждень після опіку знижуються, але до моменту повного загоєння ран знову підвищуються, не досягаючи того рівня, який був відразу після опіку (Shehab El-Din S.A. et al., 1996). За даними Magano, величина й динаміка змін TNF, IL-1 $\beta$  і IL-6 відображає тяжкість перебігу опікової хвороби й характер загоєння опіків, а за зміною рівня сироваткового IL-8 можна зробити висновок про ураження дихальної системи. При синдромі системної запальної відповіді (сепсисі) рівень TNF- $\alpha$ , IL-8 і IL-6 у хворих досягає дуже високих значень (Yeh F.L., Lin W.L., Shen H.D., Fang R.H., 1999). Їхній високий рівень у крові був виявлений у всіх загиблих обпалених. На відміну від крові в рідині опікових міхурів у хворих IL-1 і IL-8 виявляються в мінімальних кількостях (Ono I., Gunji H., Zhang J.-Z. et al., 1995).

Системне порушення біосинтезу й метаболізму цитокінів призводить до порушень імунологічного характеру. Формування вторинного імунodefіцитного стану пов'язують із активацією вільних радикалів кисню й оксиду азоту (Костенко В.О., 2008–2011). І якщо роль окислювально-антиоксидантних процесів у механізмах розвитку ран різної етіології досить добре вивчена, то участь оксиду азоту не цілком з'ясована. Тому наступний етап роботи був присвячений

вивченню метаболітів NO і їх можливого зв'язку з прозапальними цитокінами при опіковій рані.

У тварин з термічним опіком вміст метаболітів оксиду азоту в сироватці крові був збільшений протягом перших 3 тижнів спостереження в порівнянні з показником інтактних тварин. На 3-тю добу вміст метаболітів оксиду азоту досяг максимуму, перевищуючи норму у 2,2 разу, на 7-му добу – у 2 рази, на 14-ту й 21-шу добу їх вміст перевищував аналогічний показник інтактних тварин на 79 і 39 % відповідно.

При кореляційному аналізі між вмістом прозапальних інтерлейкінів і метаболітів NO у крові встановлено високої тісноти зв'язок між TNF- $\alpha$  і NO ( $r=0,9$ ).

У вогнищі збільшення вмісту метаболітів NO було ще більш вираженим і тривалим – протягом усього часу спостереження в порівнянні з інтактними тваринами. Так, на 3-тю добу вміст метаболітів оксиду азоту перевищував норму у 2 рази, на 7-му добу – у 2,9 разу, досягаючи максимальних значень, на 14-ту добу – в 1,9 разу, на 21-шу добу – в 1,7 разу, на 28-му добу – в 1,4 разу.

При використанні метилурацилової мазі підвищення вмісту метаболітів оксиду азоту в крові тварин відносно показника інтактних тварин спостерігалося лише протягом першого тижня експерименту (на 3-тю добу – в 1,6 разу, на 7-му добу – в 1,4 разу), до 14-ї доби – знижувалося до норми, залишаючись таким до кінця експерименту. При цьому протягом 3–21-ї доби вміст оксиду азоту був достовірно нижчим, ніж у групі з опіком без лікування (на 3-тю добу – в 1,4 разу, на 7-му добу – в 1,5 разу, на 14-ту – в 1,6 разу, на 21-шу – в 1,3 разу).

У цій групі тварин виявлено тісний кореляційний зв'язок між TNF- $\alpha$  і метаболітами NO ( $r=1$ ), IL-8 і метаболітами NO ( $r=0,9$ ) і помірний ступінь тісноти між IL-1 $\beta$  і метаболітами NO ( $r=0,6$ ).

У шкірі під дією метилурацилової мазі, як і в крові, вміст оксиду азоту був підвищеним лише протягом першого тижня спостереження (на 3-тю добу – у 2,2 разу, на 7-му добу – в 2,1 разу). Зниження показників до норми відбувалося на 14-ту добу і залишалось у межах фізіологічних показників до кінця спостереження. При цьому протягом 7–28-ї доби вміст оксиду азоту був достовірно нижчим, ніж у групі з опіком без застосування мазі: на 7-му добу – в 1,4 разу, на 14-ту – в 1,8 разу, на 21-шу – в 1,7 разу й на 28-му добу – в 1,6 разу).

Дослідження рівня метаболітів оксиду азоту в крові тварин, що одержували лікування маззю тіотриазоліну, так само, як і в групі із застосуванням метилурацилової мазі, показало його підвищення відносно показника інтактних тварин тільки протягом першого тижня. При цьому протягом 3-х тижнів спостереження рівень NO був вірогідно нижчим, ніж у групі з опіком без лікування: на 3-тю добу – на 21 %, на 7-му – на 26 %, на 14-ту – на 34 %, на 21-шу добу – на 20 %.

У даній групі тварин виявлено сильний кореляційний зв'язок між усіма вивченими інтерлейкінами і метаболітами NO ( $r=0,9$ ).

У вогнищі вміст оксиду азоту під впливом мазі тіотриазоліну (як і метилурацилової) було збільшено тільки протягом першого тижня експерименту в

порівнянні з показником інтактних тварин (на 3-тю й 7-му добу – у 2 рази). Протягом 7–28-ї доби досліджуваний показник був вірогідно нижчим, ніж у групі з опіком без застосування препаратів (на 7-му добу – в 1,5 разу, на 14-ту добу – в 1,5 разу, на 21-шу добу – в 1,5 разу, на 28-му добу – в 1,4 разу), повторюючи таким чином кінетику змін у крові під впливом мазі тіотриазоліну.

Як видно з результатів досліджень, перебіг експериментального опіку супроводжується тривалим і значним підвищенням вмісту метаболітів оксиду азоту в периферичній крові й особливо у вогнищі (не менше 28 діб). Застосування лікарських засобів, які стимулюють загоєння, з різним механізмом дії приводить до швидкого (на 14-ту добу) зниження NO до фізіологічних показників як у вогнищі, так і в крові, що супроводжується більш сприятливим перебігом ранового процесу й вираженим зменшенням площі опікової рани в цих групах.

Під впливом оксиду азоту окислюються тіоли з утворенням нітрозотіолів, що позначається на вмісті SH-груп у крові (Коган А.Х., Кудрін А.Н., Кактурський Л.В. та співавт., 1992), а отже, приводить до зниження їх протекторної активності.

Дослідження рівня SH-груп у периферичній крові тварин із природним перебігом патологічного процесу показало його стабільне зниження протягом усього часу дослідження відносно рівня у інтактних щурів (на 3-тю добу – в 1,2 разу, на 7-му добу – в 1,9 разу, на 14-ту добу – в 1,4 разу, на 21-шу добу – в 1,3 разу, на 28-му добу – в 1,2 разу). Проведений кореляційний аналіз між вмістом IL і SH-груп у крові виявив сильний негативної тісноти зв'язок між IL-1 $\beta$  і SH-групами ( $r=-0,8$ ), IL-8 і SH-групами ( $r=-0,7$ ) і помірної тісноти зв'язок між TNF- $\alpha$  і SH-групами ( $r=-0,4$ ).

Вміст SH-груп у вогнищі залишався зниженим протягом перших трьох тижнів дослідження відносно показника інтактних щурів. Так, на 3-тю добу він був нижчим за норму в 1,8 разу, на 7-му – в 1,6 разу, на 14-ту – в 1,4 разу, на 21-шу добу – в 1,3 разу, на 28-му добу – в 1,2 разу.

У групі тварин із застосуванням метилурацилової мазі вміст SH-груп у периферичній крові протягом перших 3 тижнів спостереження залишався в межах фізіологічних коливань. До кінця експерименту вміст SH-груп у периферичній крові тварин підвищився на 18 % відносно такого у інтактних тварин. При цьому протягом 7–28-ї доби вміст SH-груп був достовірно вищим, ніж у групі з опіком без лікування (на 7-му добу – в 1,8 разу, на 14-ту добу – в 1,4 разу, на 21-шу добу – в 1,5 разу, на 28-му добу – в 1,4 разу).

У цій групі тварин виявлено високий негативний кореляційний зв'язок між TNF- $\alpha$  і SH-групами ( $r=-0,7$ ), помірний кореляційний зв'язок між IL-8 і SH-групами ( $r=-0,6$ ) і між IL-1 $\beta$  і SH-групами ( $r=-0,4$ ).

Вміст SH-груп у вогнищі при застосуванні метилурацилової мазі протягом 3–21-ї доби був достовірно нижчим за показники інтактною групи, лише до 28-ї доби досягав фізіологічних показників. Так, на 3-тю добу вміст SH-груп був нижчим за норму на 29 %, на 7-му добу – на 28 %, на 14-ту добу – на 13 %, на 21-шу добу – на 12 %.

У групі тварин із застосуванням мазі тіотриазоліну (як і метилурацилової) вміст SH-груп у периферичній крові протягом перших 3 тижнів спостереження залишався в межах фізіологічних коливань. Наприкінці експерименту вміст SH-груп у периферичній крові тварин підвищився на 27 % відносно показника інтактних тварин. Як і при застосуванні метилурацилової мазі, вміст SH-груп був достовірно вищим, ніж у групі з опіком протягом 7–28-ї доби (на 7-му добу – в 1,7 разу, на 14-ту добу – в 1,3, на 21-шу добу – в 1,4, на 28-му добу – в 1,6 разу).

Проведений кореляційний аналіз у цій групі тварин дозволив виявити сильний тісний негативний кореляційний зв'язок між TNF- $\alpha$  і SH-групами ( $r=-1$ ) і двома іншими досліджуваними інтерлейкінами і SH-групами ( $r=-0,9$ ).

Рівень SH-груп у вогнищі при застосуванні мазі тіотриазоліну протягом 3–21-ї доби був вірогідно нижчим за показники інтактною групи, лише до 28-ї доби досягав фізіологічних показників. Так, на 3-тю добу вміст SH-груп був нижчим за норму на 33 %, на 7-му добу – на 32 %, на 14-ту добу – на 21 %, на 21-шу добу – на 18 %.

Таким чином, зміни вмісту SH-груп у вогнищі при опіковій травмі мали більш тяжкий характер, ніж у крові, відбиваючи тяжкі метаболічні порушення в рані. Місцеве застосування ранозагоюючих препаратів підтверджує цю закономірність. Відновлення кількості SH-груп до норми в шкірі вогнища під впливом метилурацилової мазі й мазі тіотриазоліну відбувається тільки до 28-ї доби експерименту, у той час як у крові їх вміст не зменшується. Виражене й тривале зниження кількості сульфгідрильних груп в опіковій рані свідчить про руйнування білків, амінокислот, пуринових і піримідинових лугів, РНК, ДНК, про зміну синтезу й властивостей структурних білків.

Підбиваючи підсумки власних досліджень і літературних даних останніх років, можна зробити висновок, що хронізація процесів загоєння при опіках – результат порушення складного багатоклітинного процесу, міжклітинних взаємодій, серед яких важлива роль належить прозапальним цитокінам. Експресія прозапальних цитокінів є результатом і причиною порушення міжклітинних взаємодій. Особливість запальної реакції при опіковій рані – масштабність альтеративного компонента, а не фрагментарність, пов'язана із загибеллю певних клітин і структур, як це буває при звичайній гострій рані. Останнє є не що інше, як генетично закріплений механізм, спрямований на елімінацію чужорідного агента й відновлення гомеостазу. Зростаюче ушкодження при термічному опіку спричинює персистуюче запалення, що, у свою чергу, пролонгує загоєння, порушує структурно-метаболічні, імунологічні процеси як у вогнищі термічного опіку, так і в організмі в цілому.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведено теоретичне узагальнення й здійснено вирішення актуального наукового завдання – на підставі імуноферментних, біохімічних, морфологічних, імуноморфологічних методів дослідження в експерименті з'ясовано роль прозапальних цитокінів, їхній взаємозв'язок з метабо-

лічними порушеннями в механізмах затримки загоєння, хронізації опікової рани.

1. Розвиток опікової рани у щурів характеризується вираженим і тривалим підвищенням вмісту маркерних прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  (протягом 21-ї доби), TNF- $\alpha$  і IL-8 (протягом 28-ї доби) у крові й асоційоване з накопиченням метаболітів оксиду азоту і дефіцитом SH-груп (протягом 28 діб) у крові, супроводжується порушенням морфогенезу, процесів репаративної регенерації у вигляді переваги альтеративних процесів, порушення процесів проліферації, диференціювання й ороговіння епідермісу, запальними інфільтратами у вогнищах, ознаками фіброзування сполучної тканини.

2. Перебіг загоєння опікової рани за умов застосування ранозагоюючого препарату з анаболічним механізмом дії – метилурацилової мазі відрізняється скороченням періоду підвищення вмісту прозапальних цитокінів (IL-1 $\beta$  і IL-8 до 7 діб, TNF- $\alpha$  до 14 діб) у крові й сполучене зі зменшенням періоду накопичення метаболітів оксиду азоту (до 7 діб) при нормальному вмісті SH-груп у крові, супроводжується в більшості спостережень обмеженням деструктивних змін, викликаних термічним ушкодженням в епідермісі, дермі й підшкірно-жировій клітковині, формуванням грануляційної тканини, її дозріванням, епітелізацією і в цілому прискоренням процесу загоєння.

3. Перебіг загоєння опікової рани за умов застосування ранозагоюючого лікарського засобу з антиоксидантним механізмом дії – мазі тіотриазоліну має найбільш сприятливий перебіг на тлі нормалізації цитокінового профілю (підвищення вмісту IL-1 $\beta$  і IL-8 лише протягом першого тижня, TNF- $\alpha$  – протягом двох тижнів), вмісту метаболітів оксиду азоту (підвищення лише протягом першого тижня), незміненої концентрації SH-груп у крові та характеризується інтенсивним перебігом процесів репарації, що проявляється у вигляді обмеження деструктивного процесу в межах епідермісу й дерми, відсутності гнійно-некротичних ускладнень, раннього виникнення і рівномірного дозрівання молодой сполучної тканини, її епітелізацією з нормалізацією процесів проліферації й диференціювання епідерміоцитів.

4. Різде зменшення кількості клітин-продуцентів IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 у вогнищі термічного ушкодження з їхнім повільним відновленням до 21-ї доби супроводжується стабільним тривалим збільшенням вмісту метаболітів оксиду азоту й зниженням кількості SH-груп у шкірі (протягом 3 тижнів).

5. Загоєння рани за умов застосування метилурацилової мазі супроводжується прискоренням відновлення кількості клітин-продуцентів IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 на 7-му добу, скороченням періодів підвищення вмісту метаболітів оксиду азоту (до 1 тижня) при зниженій концентрації SH-груп (протягом 3 тижнів) у шкірі ранового вогнища.

6. Розвиток опікової рани за умов застосування мазі тіотриазоліну має аналогічну з таким при застосуванні метилурацилової мазі кінетику відновлення клітин-продуцентів прозапальних цитокінів (відрізняючись особливо інтенсивним відновленням клітин-продуцентів IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$ ), вмісту метаболітів оксиду азоту й SH-груп у шкірі ранового вогнища.

7. У процесі порушення репаративної регенерації опікової рани виявлено взаємозв'язок між TNF- $\alpha$  і метаболітами оксиду азоту ( $r=0,9$ ) і зворотний взаємозв'язок між інтерлейкінами й SH-групами (для IL-1 $\beta$   $r=-0,8$ , для TNF- $\alpha$   $r=-0,4$ , для IL-8  $r=-0,7$ ) у крові. Активація процесів репарації сполучена з обмеженням зростання кількості прозапальних цитокінів, метаболітів оксиду азоту й накопиченням SH-груп у крові.

### СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Звягинцева Т. В. Провоспалительные цитокины в развитии экспериментального ожога / Т. В. Звягинцева, А. В. Кривошапка, С. И. Миронченко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2010. – Т. 10, № 4 (32). – С. 78–82. *(Здобувач самостійно провів експериментальні дослідження, опрацював та описав одержані результати, підготував статтю до друку; інтерпретація отриманих даних здійснена спільно з науковим керівником).*

2. Звягинцева Т. В. Влияние ранозаживляющих лекарственных средств с разными механизмами действия на уровень провоспалительных цитокинов при ожоговой травме у крыс / Т. В. Звягинцева, А. В. Кривошапка, Е. В. Желнин // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2011. – № 1 (50). – С. 57–60. *(Здобувач самостійно провів експериментальні дослідження, опрацював та описав одержані результати, підготував статтю до друку; інтерпретація отриманих даних здійснена спільно з науковим керівником).*

3. Звягинцева Т. В. Морфологические изменения кожи крыс после термического ожога при применении мазевых препаратов с разным механизмом действия / Т. В. Звягинцева, А. В. Кривошапка, О. В. Наумова // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2011. – Т. 11, № 2. – С. 34–38. *(Здобувач самостійно провів експериментальні дослідження, опрацював та описав одержані результати, підготував статтю до друку; інтерпретація отриманих даних здійснена спільно з науковим керівником та патоморфологом канд. мед. наук, доц. О.В. Наумовою).*

4. Звягинцева Т. В. Роль метаболитов оксида азота в механизмах развития экспериментального ожога / Т. В. Звягинцева, А. В. Кривошапка, Е. В. Желнин // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2011. – № 2 (51). – С. 57–60. *(Здобувач самостійно провів експериментальні дослідження, опрацював та описав одержані результати, підготував статтю до друку; інтерпретація отриманих даних здійснена спільно з науковим керівником).*

5. Пат. № 54891 Україна, МПК G09B 23/28. Пристрій для моделювання термічних опіків / Звягинцева Т. В., Кривошапка О. В. ; заявник та патентовласник Харківський національний медичний університет. – № u2010 06802 ; заявл. 02.06.10 ; опубл. 25.11.10, Бюл. № 22. *(Здобувач є автором ідеї).*

6. Кривошапка О. В. Обґрунтування дослідження прозапальних цитокінів у рановому процесі / О. В. Кривошапка, І. В. Халін // Медицина третього тисячоліття : міжвузівська конференція молодих вчених та студентів, Харків,

20–21 січня 2009 р. : збірник тез. – Харків, 2009. – С. 20. *(Здобувачеві належать дані про механізми хронізації опікової рани).*

7. The role of proinflammatory cytokines at mechanisms of wound process chronization / T. Zvyagintseva, O. Kryvoshapka, I. Khalin, Ye. Zhelnin, S. Myronchenko // Book of abstracts of 6<sup>th</sup> International ISP Congress and 14<sup>th</sup> International SHR Symposium, Монреаль, Канада, September 22–25, 2010. – Монреаль, 2010. – Р. 127. *(Здобувачеві належать дані про механізми хронізації опікової рани).*

8. Звягинцева Т. В. Цитокиновый профиль крови при экспериментальной ожоговой ране / Т. В. Звягинцева, А. В. Кривошапка, С. И. Миронченко // Наука и образование в современной России : научная международная конференция, Москва, 15–18 ноября 2010 г. : материалы конф. // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 12. – С. 36–37. *(Здобувачеві належать дані про механізми хронізації опікової рани).*

9. Кривошапка А. В. Иммуноморфологические изменения кожи, подвергшейся действию локального ионизирующего излучения, при использовании мази тиотриазолина / А. В. Кривошапка, С. И. Миронченко, Е. В. Желнин // Человек и лекарство : XVII Российский национальный конгресс, Москва, 12–16 апреля 2010 г. : сборник материалов (тезисы докладов). – М., 2010. – С. 679. *(Здобувачеві належать дані про імунморфофункціональний стан вогнища рани).*

10. Кривошапка А. В. Изменение цитокинового профиля при термическом ожоге у крыс под влиянием ранозаживляющих лекарственных средств / А. В. Кривошапка // Человек и лекарство : XVIII Российский национальный конгресс, г. Москва, 11–15 апреля 2011 г. : сборник материалов (тезисы докладов). – М., 2011. – С. 452.

11. Кривошапка А. В. Влияние ранозаживляющих лекарственных средств различного механизма действия на морфологию ожоговой раны / А. В. Кривошапка // Актуальные проблемы патофизиологии : XVII межгородская конференция молодых ученых, Санкт-Петербург, 20–21 апреля 2011 г. : материалы конф. – С-Пб., 2011. – С. 88–89.

12. Звягинцева Т. В. Влияние ранозаживляющих лекарственных средств с разными механизмами действия на течение экспериментального термического ожога / Т. В. Звягинцева, А. В. Кривошапка, О. В. Наумова // Актуальні проблеми онкоморфології : науково-практична конференція з міжнародною участю та III конференції Українського дивізіону інтернаціональної академії патології, Харків, 12–13 травня 2011 р. : матеріали конф. – Харків, 2011. – С. 98–99. *(Здобувачеві належать дані про морфофункціональний стан вогнища опікової рани).*

13. Кривошапка А. В. Оксид азота и сульфгидрильные группы в механизмах развития экспериментального ожога / А. В. Кривошапка, А. В. Александрова // Студенческий научный форум 2011 : III Общероссийская студенческая электронная научная конференция // Успехи современного естествознания. –

2011. – № 8. – С. 112. *(Здобувачеві належать дані про механізми хронізації опікової рани).*

14. Kryvoshapka O. Nitric oxide and sulfhydryl groups in the pathogenesis of experimental thermal burn / O. Kryvoshapka, I. Khalin // Book of abstracts of 4<sup>th</sup> International Scientific Interdisciplinary Conference for medical students and young doctors, KNMU, Kharkiv, Ukraine, April 13–14, 2011. – Kharkiv, 2011. – P. 25. *(Здобувачеві належать дані про механізми хронізації опікової рани).*

15. Кривошапка А. В. Фактор некроза опухолей (альфа) и оксид азота при экспериментальном термическом ожоге / А. В. Кривошапка // Матеріали наукових форумів, присвячених 170-річчю кафедри фармакології та клінічної фармакології національного медичного університету ім. О. О. Богомольця, Київ, 25–26 травня 2011 р. // Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2011. – С. 61.

### АНОТАЦІЯ

**Кривошапка А.В. Роль прозапальних цитокінів у механізмах хронізації опікової рани.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. – Харківський національний медичний університет МОЗ України. – Харків, 2012.

В умовах експерименту доведено, що прозапальні цитокіни ІЛ-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  і ІЛ-8 впливають на перебіг і результат запально-репаративних процесів опікової рани. Показано, що розвиток опікової рани характеризується вираженням і тривалістю, у порівнянні зі звичайною гострою раною, підвищенням маркерних прозапальних цитокінів ІЛ-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  і ІЛ-8 у крові й супроводжується порушенням репаративної регенерації, уповільненням загоєння.

Уперше проведено дослідження клітин-продуцентів прозапальних цитокінів (ІЛ-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ІЛ-8) дозволило одержати нові дані, які свідчать про різке зменшення кількості клітин і їхнє повільне відновлення у вогнищі термічного ушкодження, а також про цитопротекторну дію ранозагоюючих мазей, що підтверджується меншим спадом і прискореним відновленням клітин-продуцентів прозапальних цитокінів у вогнищі.

Встановлено взаємозв'язок між прозапальними цитокінами й метаболітами оксиду азоту й сульфгідрильними групами в периферичній крові.

*Ключові слова:* прозапальні цитокіни, опікова рана, хронічна рана.

### АННОТАЦИЯ

**Кривошапка А.В. Роль провоспалительных цитокинов в механизмах хронизации ожоговой раны.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04 – патологическая физиология. – Харьковский национальный медицинский университет МЗ Украины. – Харьков, 2012.

В диссертационной работе решена задача по выяснению роли провоспалительных цитокинов в механизмах хронизации ожоговой раны. Эксперимен-

тальными исследованиями установлено, что провоспалительные цитокины IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL-8 влияют на течение и исход воспалительно-репаративных процессов ожоговой раны. Показано, что развитие ожоговой раны характеризуется выраженным и длительным, в сравнении с обычной острой раной, повышением маркерных провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL-8 в крови и сопровождается нарушением репаративной регенерации, замедлением заживления. Доказательством участия провоспалительных цитокинов в механизмах хронизации ожоговой раны служат данные, полученные в результате применения ранозаживляющих лекарственных средств мази «Метилурациловая» и «Мази тиотриазолина 2 %». Их применение сокращает период цитокиновой активности в крови, что сопровождается ускорением процессов заживления, ограничением деструктивных изменений в коже, интенсификацией образования грануляционной ткани, ее созревания, эпителизации.

Исследования клеток-продуцентов провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8) позволили получить данные, свидетельствующие о резком уменьшении количества клеток и их медленном восстановлении в очаге термического повреждения, что сопровождается стабильным длительным увеличением содержания метаболитов оксида азота и снижением количества SH-групп в коже. Установлено цитопротекторное действие ранозаживляющих мазей, о чем свидетельствует меньшая убыль и ускоренное восстановление клеток-продуцентов провоспалительных цитокинов в очаге.

В процессе нарушения репаративной регенерации ожоговой раны обнаружена прямая зависимость между TNF- $\alpha$  и метаболитами оксида азота и обратная взаимосвязь между интерлейкинами и SH-группами в крови. Активация процессов репарации сопряжена с ограничением нарастания провоспалительных цитокинов, метаболитов оксида азота и накоплением SH-групп в крови.

Результаты исследований позволили получить данные о новых механизмах действия ранозаживляющих препаратов: мази «Метилурациловая» и «Мази тиотриазолина 2 %» – их способности модулировать цитокиновые механизмы воспаления и репарации.

*Ключевые слова:* провоспалительные цитокины, ожоговая рана, хроническая рана.

## SUMMARY

**Kryvoshapka O. V. The role of proinflammatory cytokines in the mechanisms of burn wound chronization.** – Manuscript.

Thesis for a candidate of medical sciences degree in speciality 14.03.04 – pathological physiology. – Kharkiv National Medical University, Ministry of Health of Ukraine. – Kharkiv, 2012.

In experimental model it was shown, that proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-8 influence upon the course and results of inflammatory- reparative processes of burn wound. The development of burn wound was shown to be characterized by more pronounced and longer lasting increase of marker proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-8 in the blood accompanied by disturbances of repa-

ratory processes , slowing healing as compared with ordinary acute wound. For the first time performed study of cells-producers of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-8 made it possible to get new data that show the significant decrease in number of the cells and their restoration in the area of burn damage and cytoprotective effect of wound healing ointments, that is proved by less decrease and faster restoration of cells producing proinflammatory cytokines in the area of damage. This investigation proved the existence of connection between proinflammatory cytokines and nitric oxide metabolites and SH-groups in peripheral blood of damaged area.

*Key words:* proinflammatory cytokines, burn wound, chronic wound.

### Перелік умовних скорочень

ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
РНК	– рибонуклеїнова кислота
МКА	– моноклональні антитіла
ПОЛ	– перекисне окиснення ліпідів
ЦНС	– центральна нервова система
ІЛ	– інтерлейкіни
ІЛ-1 $\beta$	– інтерлейкін 1 бета
TNF- $\alpha$	– фактор некрозу пухлин альфа
ІЛ-8	– інтерлейкін 8
NO	– оксид азоту
SH	– сульфгідрильні

Підписано до друку Формат 60x84/16.

Папір офсетний. Друк ризографія.

Умовних друк. арк. . Тир. 100 прим. Зам. № .

Надруковано СПД ФО Бровін О.В.

61022, м. Харків, майдан Свободи, 7 Т. (057) 758-01-08.