

*На правах рукописи*



**Агеева Анна Алексеевна**

**Патогенетическое обоснование применения мелатонина  
при термической травме (экспериментальное исследование)**

3.3.3. Патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Осиков Михаил Владимирович**

**Официальные оппоненты:**

**Балмасова Ирина Петровна** - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория медико-биологических исследований, ведущий научный сотрудник

**Салмаси Жан Мустафаевич** – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лечебный факультет, кафедра патофизиологии и клинической патофизиологии, заведующий кафедрой

**Ведущая организация:** федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»

Защита диссертации состоится «21» марта 2023 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.25 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119992, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8. строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: [www.sechenov.ru](http://www.sechenov.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



**Калужин Олег Витальевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

По данным ВОЗ, ежегодно около 11 млн человек нуждаются в медицинской помощи после ожогов (WHO, 2018). На долю термической травмы (ТТ) приходится около 80% от всех ожогов. В РФ в 2018 г зарегистрировано 251480 случаев ожогов, показатель остается стабильно высоким на протяжении последних лет (Здравоохранение в России, 2019). Наиболее частыми причинами ТТ являются горячая жидкость и пламя, у 2/3 больных площадь ожога составляет менее 10% поверхности тел (Queiroz L.F. et al., 2016).

Ключевой проблемой в патогенезе ТТ является расширение зоны вторичной альтерации и прогрессирование ТТ в фазу воспаления, когда избыточное накопление аутокоидов, ферментов, активных форм кислорода (АФК), нарушение реологии и эндотелиальная дисфункция вызывают изменения в прилегающих тканях, приводят к увеличению площади и глубины ожога, а также к эскалации системных изменений гомеостаза, включая острофазовый ответ, иммуносупрессию, синдром системного воспалительного ответа (SIRS), гиперметаболизм, поражение внутренних органов (Barrett L.W. et al., 2019; Zhang P. et al., 2021). До 70% всех осложнений после ТТ связаны с инфекцией (Devine R.A. et al., 2018). В связи с данными о ключевых механизмах прогрессирования ожогов разрабатываются и с патогенетических позиций обосновываются терапевтические подходы: применение куркумина, экстракта алоэ, антицитокиновые препараты, эритропоэтин, факторы роста, антиоксиданты и др. (Korkmaz H.I. et al., 2021; Осиков М.В. и др., 2013; 2014; 2016; 2019). Потенциальными терапевтическими агентами при ТТ являются регуляторы гомеостаза эндогенного происхождения комплексного действия с минимальным набором побочных эффектов.

Мелатонин (МТ) – мультитропный, полифункциональный эндогенный регулятор гомеостаза на всех этапах онтогенеза, участвующий в формировании аллостаза при патологии, проявляющий антиоксидантные, иммуномодулирующие, регулирующие пролиферацию и дифференцировку клеток, и др. свойства, определяющие его широкий терапевтический потенциал (Chitimus D.M. et al., 2020; Осиков М.В. и др., 2016). Предпосылками применения МТ при ТТ явились данные о собственной мелатонинергической системе кожи: продуцирующими МТ и имеющими рецепторы для него кератиноцитами, меланоцитами, дермальными фибробластами и др. клетками, сведения об изменении ритма секреции МТ при ТТ, влиянии МТ на пролиферацию, дифференцировку эпидермоцитов после повреждения кожи ультрафиолетом, ионизирующим излучением (Slominski A.T. et al., 2020; Dong K. et al., 2020; Chitimus D.M. et al., 2020).

Среди раневых покрытий неподдельный интерес представляют дермальные пленки (ДП): они просты в использовании, повышают комплаентность пациентов с ожогами небольшой

площади, относительно дешевы, обеспечивают эффективный способ поступления активного компонента в рану и окружающую кожу, позволяют избежать необходимости или снизить системное применение лекарственных средств и как следствие их побочные эффекты, обеспечивают защиту раны от инфекций и механических повреждений. В настоящее время в РФ отсутствуют зарегистрированные лекарственные формы МТ для применения при ТТ кожи.

### **Цель исследования**

С патогенетических позиций обосновать эффективность локального в составе оригинальной дермальной пленки и системного применения мелатонина при экспериментальной термической травме.

### **Задачи исследования**

1. Исследовать показатели репарации, морфологии, количество и активность тучных клеток, экспрессию MMP-9 и VEGF, параметры свободнорадикальной деструкции липидов и белков в очаге повреждения в динамике экспериментальной термической травмы.
2. Изучить количественный состав лейкоцитов и субпопуляций лимфоцитов, лимфоцитов с маркерами апоптоза и некроза, функциональную активность нейтрофилов в крови, концентрацию в сыворотке мелатонина, С-РБ, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, Ig M, Ig G в динамике экспериментальной термической травмы.
3. Оценить влияние мелатонина в составе оригинальной дермальной пленки на показатели репарации, морфологии, количество и активность тучных клеток, экспрессию MMP-9 и VEGF в очаге повреждения в динамике экспериментальной термической травмы.
4. Исследовать влияние мелатонина в составе оригинальной дермальной пленки на параметры свободнорадикальной деструкции липидов и белков в очаге повреждения, показатели иммунного статуса в крови в динамике экспериментальной термической травмы.
5. Оценить влияние внутрибрюшинного применения мелатонина на морфологические, иммуногистохимические показатели, параметры свободнорадикальной деструкции липидов и белков в очаге повреждения, иммунного статуса в крови и провести сравнительный анализ эффектов мелатонина в составе оригинальной дермальной пленки и системного применения мелатонина в динамике экспериментальной термической травмы.

### **Научная новизна исследования**

Впервые проведен комплексный анализ изменений морфологии, содержания и активности тучных клеток, экспрессии MMP-9 и VEGF, содержания продуктов окислительной деструкции белков и липидов в очаге повреждения, показателей иммунного статуса в крови в динамике экспериментальной ТТ. Установлено, что от 5 к 20 суткам ТТ в очаге повреждения уменьшается количество нейтрофилов, увеличивается – лимфоцитов, гистиоцитов, фибробластов, общее количество и дегрануляция тучных клеток, экспрессия MMP-9 и VEGF, уменьшение площади

раны происходит по мере увеличения в ней экспрессии MMP-9, VEGF, дегрануляции тучных клеток. Особенности окислительного стресса в ожоговой ране являются одновременный прирост вторичных и конечных гептан- и изопропанол-растворимых продуктов липопероксидации, усиление спонтанной и металл-катализируемой окислительной модификации белков. Установлено, что изменения показателей иммунного статуса при ТТ включают увеличение количества в крови нейтрофилов, моноцитов, поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов, концентрации в сыворотке С-РБ, TNF- $\alpha$  и IL-4, количества лимфоцитов с признаками апоптоза и некроза, снижение количества в крови CD3<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, концентрации в сыворотке Ig G. Впервые установлено протекторное действие при экспериментальной ТТ МТ в составе оригинальной дермальной пленки (**Пат. РФ № 2751048 от 07.07.2021 г**), которое проявляется сокращением площади и ускорением эпителизации ожоговой раны, снижением содержания в ней нейтрофилов, гистиоцитов, увеличением – лимфоцитов, фибробластов. Внутрибрюшинное применение МТ при ТТ оказывает менее выраженный протекторный эффект по сокращению площади ожоговой раны, содержанию в ней нейтрофилов, гистиоцитов, лимфоцитов. Впервые продемонстрировано, что механизм протекторного действия МТ при ТТ включает изменение в ожоговой ране в зависимости от срока наблюдения количества и дегрануляции тучных клеток, экспрессии MMP-9 и VEGF, снижение содержания преимущественно вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов в гептановой и в изопропанольной фазах, содержания ранних и поздних продуктов окислительной модификации белков нейтрального характера, что подтверждается наличием ассоциации между площадью ожога и экспрессией в ране VEGF, MMP-9, содержанием дегранулированных тучных клеток, продуктов перекисного окисления липидов, продуктов окислительной модификации белков. Установлено, что применение МТ внутрибрюшинно и особенно в составе оригинальной дермальной пленки при ТТ приводит к снижению выраженности ответа острой фазы количества в крови моноцитов, количества и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов, концентрации в сыворотке TNF- $\alpha$ , С-РБ. Показано, что применение МТ внутрибрюшинно и особенно в составе оригинальной дермальной пленки при ТТ полностью или частично восстанавливает показатели иммунного статуса на основании повышению количества лимфоцитов, в том числе CD3<sup>+</sup> и CD45RA<sup>+</sup>, снижению количества лимфоцитов с признаками апоптоза и некроза, снижения концентрации в сыворотке IL-4, повышения – Ig G.

#### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

В ходе проведенного исследования в экспериментальных условиях получены новые фундаментальные знания о закономерностях изменений иммунологических параметров в крови, редокс-статуса и морфологии очага повреждения, включая содержание и активность тучных клеток, экспрессию VEGF, MMP-9, при экспериментальной ТТ, что расширяет современные

представления о механизме развития ожогов. Показано, что площадь ожога при экспериментальной ТТ, в том числе, связана с экспрессией MMP-9, VEGF, дегрануляцией тучных клеток в очаге повреждения кожи. Полученные результаты комплексной оценки изменений гомеостаза при экспериментальной ТТ могут быть использованы для обоснования разработки новых терапевтических подходов и диагностических маркеров.

С патогенетических позиций обосновано применение при экспериментальной ТТ нового лекарственного средства – МТ в составе ДП, которое позволяет ускорить заживление, снизить площадь ожоговой раны в динамике ТТ, что более выражено по сравнению с эффектом МТ при внутрибрюшинном применении. Показано, что протекторное действие МТ реализуется за счет локального антиоксидантного эффекта в очаге повреждения, изменения в зависимости от срока наблюдения количества и дегрануляции тучных клеток, экспрессии MMP-9 и VEGF, коррекции врожденного и адаптивного иммунитета. Представленные в работе экспериментальные результаты являются предпосылкой для проведения дальнейших исследований по эффективности применения МТ при ТТ ограниченной площади с последующим внедрением нового лекарственного препарата в клиническую практику.

#### **Методология и методы исследования**

Методология диссертационной работы была спланирована в соответствии с целью и задачами исследования. Организация исследования одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 10 от 15.11.2019, протокол № 13 28.12.2020).

Экспериментальные исследования выполнены на 301 крысе линии Wistar массой  $240 \pm 20$  г в экспериментально-биологической клинике (виварии) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России. Эксперимент проводился при строгом соблюдении требований по уходу и содержанию животных, а также выводу их из эксперимента с последующей утилизацией в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18.03.1986, Страсбург), Рекомендациями Европейской Комиссии 2007/526/ЕС от 18 июня 2007 года, Директивой 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

Методы исследования включали: экспериментальное моделирование, гематологические, биохимические, иммунологические с использованием специфических тест-систем для крыс, иммуноферментного анализа, морфологические и иммуногистохимические, фармацевтические, статистического анализа.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. При экспериментальной ТТ площадь ожоговой раны уменьшается по мере увеличения экспрессии в очаге MMP-9, VEGF, дегрануляции тучных клеток; в ожоговой ране увеличивается

содержание продуктов окислительной деструкции белков и липидов; в крови признаки ответа острой фазы сочетаются со снижением количества  $CD3^+$ ,  $CD45RA^+$ , снижением концентрация  $IL-4$ ,  $Ig G$  в сыворотке.

2. Применение при ТТ МТ в составе дермальной пленки ускоряет эпителизацию и сокращает площадь ожоговой раны, уменьшает содержание в ней нейтрофилов, гистиоцитов, увеличивает содержание лимфоцитов, что более выражено по сравнению с эффектом от внутрибрюшинного применения МТ.

3. Механизм ускоряющего репарацию эффекта МТ при ТТ включает изменение экспрессии MMP-9, VEGF, количества и активности тучных клеток, ограничение окислительной деструкции липидов и белков в очаге, полное или частичное восстановление показателей иммунного статуса в крови.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов работы, правомочность основных положений и выводов основаны на достаточном числе наблюдений экспериментального фрагмента работы, полноте и широте литературно-библиографической справки, использовании современных методов статистической обработки материалов исследования с использованием пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 19.

Основные положения диссертации представлены на Всероссийской научно-практической конференции «Современная патология: опыт, проблемы, перспективы» (Самара, 2020); XXVII всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург, 2021), научно-практической сессии «Дни науки в Челябинской области» (Челябинск, 2021).

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры Патологической физиологии, кафедры Фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России научную работу научно-образовательного центра «Проблемы фундаментальной медицины» ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России.

### **Конкурсная поддержка исследования**

Работа проводилась при финансовой поддержке РФФИ и Челябинской области в рамках научного проекта № 20-415-740016 и ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» в рамках программы У.М.Н.И.К. (договор № 15583ГУ/2020 от 05.07.2020 г).

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Основные научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

## Публикации

По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 12 работ в рецензируемых научных изданиях в изданиях из Перечня ВАК при Минобрнауки России (из них 2 – в электронных изданиях), в том числе 5 – в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования (Web of Science, Scopus), 2 – в материалах конференций, получен 1 патент РФ на изобретение.

### Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 217 страницах и состоит из введения, обзора литературы, главы, описывающей материалы и методы исследования, изложения результатов собственного исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Библиографический указатель включает 44 отечественный и 315 зарубежных источника литературы. Работа содержит 55 таблиц и 30 рисунков (включая 3 схемы).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

Проведены экспериментальные исследования *in vivo* на 301 крысах - самцах линии Wistar массой 240±20 г. Для общей анестезии внутримышечно вводили препарат «Золетил» (МНН: тилетамин гидрохлорид, золазепам гидрохлорид, «Virbac Sante Animale», Франция) в дозе 20 мг/кг. Животные были случайным образом разделены на 5 групп (табл. 1).

Таблица 1 – Характеристика экспериментальных групп

Группы	Местное лечение	Системное лечение	Сроки исследований	Кол-во крыс
1. Интактные	-	-	-	48
2. ТТ+АсП	асептическая повязка, ежедневная смена до 20 суток	-	5, 10, 20 сутки	63
3. ТТ+ДП	ДП (ДП-матрица) + асептическая повязка, ежедневная смена до 20 суток	-	5, 10, 20 сутки	65
4. ТТ+МТ ДП	МТ (5 мг/г) в составе ДП 5 суток + асептическая повязка, ежедневная смена до 20 суток	-	5, 10, 20 сутки	61
5. ТТ+МТ	асептическая повязка, ежедневная смена до 20 суток	МТ в/брюш. 10 мг/кг 5 суток	5, 10, 20 сутки	64

**Термическая травма.** Использована модифицированная модель ТТ Уокера-Мейсона с горячей водой (Menegat T.A. et al., 2019; Walker H.L. et al., 1968). Через 24 часа проводили иссечение некротизированных участков раны. Морфологическими критериями ТТ II степени по



МКБ-10 являлось развитие коагуляционного некроза, распространяющегося до сосочкового слоя дермы. Площадь ожога составила  $3,36 \pm 0,12\%$ .

В группах 3 и 4 применяли ДП-матрицу и ДП с МТ площадью  $12 \text{ см}^2$ . Для внутрибрюшинного введения применяли раствор МТ («ФЛАММА С.П.А.», Италия).

**Морфологические и иммуногистохимические методы.** Данный фрагмент выполнен в ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» Минздрава Челябинской области при участии руководителя отдела поисковых исследований к.м.н. Астаховой Л.В., за что автор выражает ей искреннюю благодарность.

Состояние дефекта кожи после ТТ оценивали макроскопически. Для оценки показателей репарации ожоговой раны измеряли площадь раневого дефекта методом цифровой планиметрии с использованием цифровой фотокамеры «Nikon Coolpix S2800» (Китай) и стандартного пакета программ «Microsoft Office Visio» (США). Планиметрическое исследование выполнялось через 24 часа, на 5, 10 и 20 сутки после ТТ.

Морфометрические исследования проводили с помощью программы «Image Scope M» (Россия) при увеличении  $\times 400$  и  $\times 100$  в 10 случайно отобранных полях зрения. Подсчитывали на микроскопе «DMRXA» («Leika», Германия) на  $1 \text{ мм}^2$  количество фибробластов, нейтрофилов, гистиоцитов, лимфоцитов (Автандилов Г.Г., 2002). Тучные клетки оценивали после окрашивания срезов толуидиновым синим ( $\text{pH} = 2,0$ ) («Biovitrum», Россия). Подсчитывали общее количество тучных клеток ( $\text{ед./мм}^2$ ), количество клеток в разной степени дегрануляции; среднюю яркость, коэффициент дегрануляции.

Иммуногистохимическим методом оценивали содержание MMP-9 и VEGF в ожоговой ране с использованием наборов специфических первичных антител – поликлональные антитела к MMP-9 крысы (host – rabbit, каталожный № PAA553Ra01 «Cloud-Clone Corp.», Китай) и поликлональные антитела к VEGF крысы (host – rabbit, каталожный № PAA143Ra01 «Cloud-Clone Corp.», Китай) и полимерная система детекции «Rabbit HRP/DAB Detection IHC Detection Kit» («Abscam», Латвия). В качестве субстрата/хромогена для визуализации полимерного комплекса в системе использован диаминобензидин, результат выражали в  $\text{ед./мм}^2$ .

**Биохимические методы.** Содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли экстрационно-спектрофотометрическим методом на спектрофотометре «СФ-56» («ЛОМО – Спектр», Санкт – Петербург) в гомогенате (Волчегорский И.А. и др., 1989; Волчегорский И.А. и др., 2000; Львовская Е.И. и др., 1991). Относительное содержание продуктов ПОЛ выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.):  $E_{232}/E_{220}$  (ДК),  $E_{278}/E_{220}$  (КД и СТ) и  $E_{400}/E_{220}$  (ШО). Продукты окислительной модификации белков (ОМБ) в гомогенате определяли количественно по реакции карбонильных производных белков с 2,4 – динитрофенилгидразином в спонтанном и металл-зависимом по реакции Фентона режимах с

последующей регистрацией на спектрофотометре альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ) и кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ) в ультрафиолетовой части спектра и в области видимого света (Фомина М. А. и др., 2014). Результат выражали в единицах оптической плотности на мг белка (у.е./мг). Резервно-адаптационный потенциал (РАП, %) рассчитывали путем отношения продуктов спонтанного окисления к индуцированному. Концентрацию МТ в плазме определяли методом капиллярного электрофореза на аппарате «Капель-105М» («Люмэкс», СПб), результаты выражали в пг/мл (Kim Y.O. et al., 1999).

**Гематологические и иммунологические методы.** На гематологическом анализаторе для ветеринарии «BC-2800 Vet» («Mindray», Китай) определяли количество в крови лейкоцитов. Лейкоцитарную формулу подсчитывали в мазках крови, окрашенных азур II-эозином («Гемстандарт-Р», Россия). Поглотительную способность нейтрофилов крови исследовали с частицами монодисперсного полистирольного латекса. Кислород-зависимый метаболизм нейтрофилов крови исследовали в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте (Маянский М.Е. и др., 1979). На проточном цитофлуориметре «Navios» («BeckmanCoulter», США) с использованием крысиных моноклональных антител («BeckmanCoulter», США) определяли количество лимфоцитов ( $\cdot 10^9/\text{л}$ ) с фенотипом  $\text{CD3}^+$  и  $\text{CD45RA}^+$ ; с помощью тест-системы «Annexin-5-FITC/7-AAD kit» («BeckmanCoulter», США) дифференцировали интактные лимфоциты (Annexin-5-FITC-/7-AAD -), лимфоциты с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-), поздними признаками апоптоза и частично некротические (Annexin-5-FITC+/7-AAD+). На иммуноферментном анализаторе «Personal LAB» (Италия) с помощью специфичной для крыс тест-системы («Bender Medsystems», Австрия) определяли концентрацию (пг/мл) в сыворотке IL-4, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , С-РБ, а также концентрацию (нг/мл) IgG и IgM с применением специфических тест-систем для крыс фирмы «Cloud-Clone Corp.» (Китай).

**Фармацевтические методы.** Данный фрагмент выполнен на кафедре Фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России при участии зав. каф., доц., к.фарм.н. Симомян Е.В. и доц., к.фарм.н. Ушаковой В.А.

ДП изготавливали на основе 4% водного раствора натрий-карбоксиметилцеллюлозы (NaКМЦ) и глицерина. В качестве действующего вещества вводили спиртовой раствор МТ. Площадь одной ДП составила 12 см<sup>2</sup>, масса – 6,0 г, содержание МТ – 0,03 г. Концентрация МТ в ДП 5 мг/г. Методика получения ДП-матрицы без МТ аналогична, но исключается введение МТ. Идентификацию МТ в ДП проводили методом тонкослойной хроматографии в системе этилацетат-гексан 1:3, количественное определение МТ в ДП – методом УФ-спектрофотометрии.

**Статистические методы.** Результаты обрабатывали с использованием программы IBM SPSS Statistics 19. Показатели представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>). Значимость различий между группами оценивали при помощи критериев Крускалла-Уолиса,

Манна-Уитни, Вальда-Вольфовитца. Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  с учётом поправки Бонферрони.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В динамике экспериментальной ТТ обнаружены известные закономерности заживления ожоговой раны и смены клеточного состава в очаге (табл. 2): от 5 к 20 суткам снижается абсолютная площадь ожоговой раны (к 20 суткам площадь уменьшается на 35% от исходной), увеличивается скорость эпителизации ожоговой раны; от 5 к 20 суткам в очаге ТТ уменьшается количество нейтрофилов, увеличивается представительство лимфоцитов, гистиоцитов, фибробластов. В очаге ТТ на 5, 10 и 20 сутки увеличивается экспрессия VEGF, а на 10 и 20 сутки увеличивается экспрессия MMP-9 – факторов, принимающих участие в репарации кожи (рис. 1). MMP-9 готовит плацдарм для репаративных реакций, успешной эпителизации, его содержание в очаге повреждения отражает количество и активность основных продуцентов: нейтрофилов и макрофагов (Lang T.C. et al., 2019). VEGF регулирует ангиогенез, синтез коллагена и др. компонентов соединительной ткани, формирование рубца (Wilgus T.A. et al., 2019).

Получены данные об изменении количества и функциональной активности тучных клеток в очаге ТТ: от 5 к 20 суткам прогрессивно увеличивается общее количество тучных клеток, на 5, 10 и 20 сутки эксперимента увеличивается количество дегранулированных тучных клеток I, II, III степени дегрануляции, что приводит к снижению гранулярного насыщения тучных клеток. Участие тучных клеток в реализации ключевых событий раневого процесса подтверждается данными корреляционного анализа о связи площади ожоговой раны с экспрессией MMP-9 и VEGF, коэффициентом дегрануляции тучных клеток в очаге ТТ. Показано, что площадь ожоговой раны уменьшается по мере увеличения экспрессии в очаге повреждения VEGF на 5 сутки, увеличения экспрессии MMP-9 на 10 и 20 сутки, увеличения дегрануляции тучных клеток на 5, 10 и 20 сутки эксперимента. В первые 5 суток, когда преобладают альтеративные (вторичная альтерация) и сосудисто-экссудативные, лейкоцитарные реакции, дегрануляция тучных клеток и высвобождение преформированных медиаторов (гистамина, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и др.) приводит к артериальной и венозной гиперемии, экссудации, активации фагоцитов (Succar J. et al., 2019). Позднее, на 10-15 сутки высвобождение из них фактора роста кератиноцитов, VEGF активирует фибробласты, синтез коллагена. Протеаза-4 из тучных клеток выступает в роли хемоаттрактанта для лейкоцитов в воспалительную фазу раневого процесса. Увеличение синтеза коллагена, в том числе, связано с активацией химазой мастоцитов сигнального пути TGF- $\beta$ 1/Smads и пролиферацией фибробластов (Chen H. et al., 2017). Серотонин, ключевым источником которого в очаге ТТ являются тучные клетки, снижает апоптоз, повышает выживаемость и миграцию

фибробластов и кератиноцитов, участвуя таким образом в регуляции заживления ожоговой раны, а применение блокаторов высвобождения эндогенного серотонина приводит к замедлению эпителизации (Sadiq A. et al., 2018).

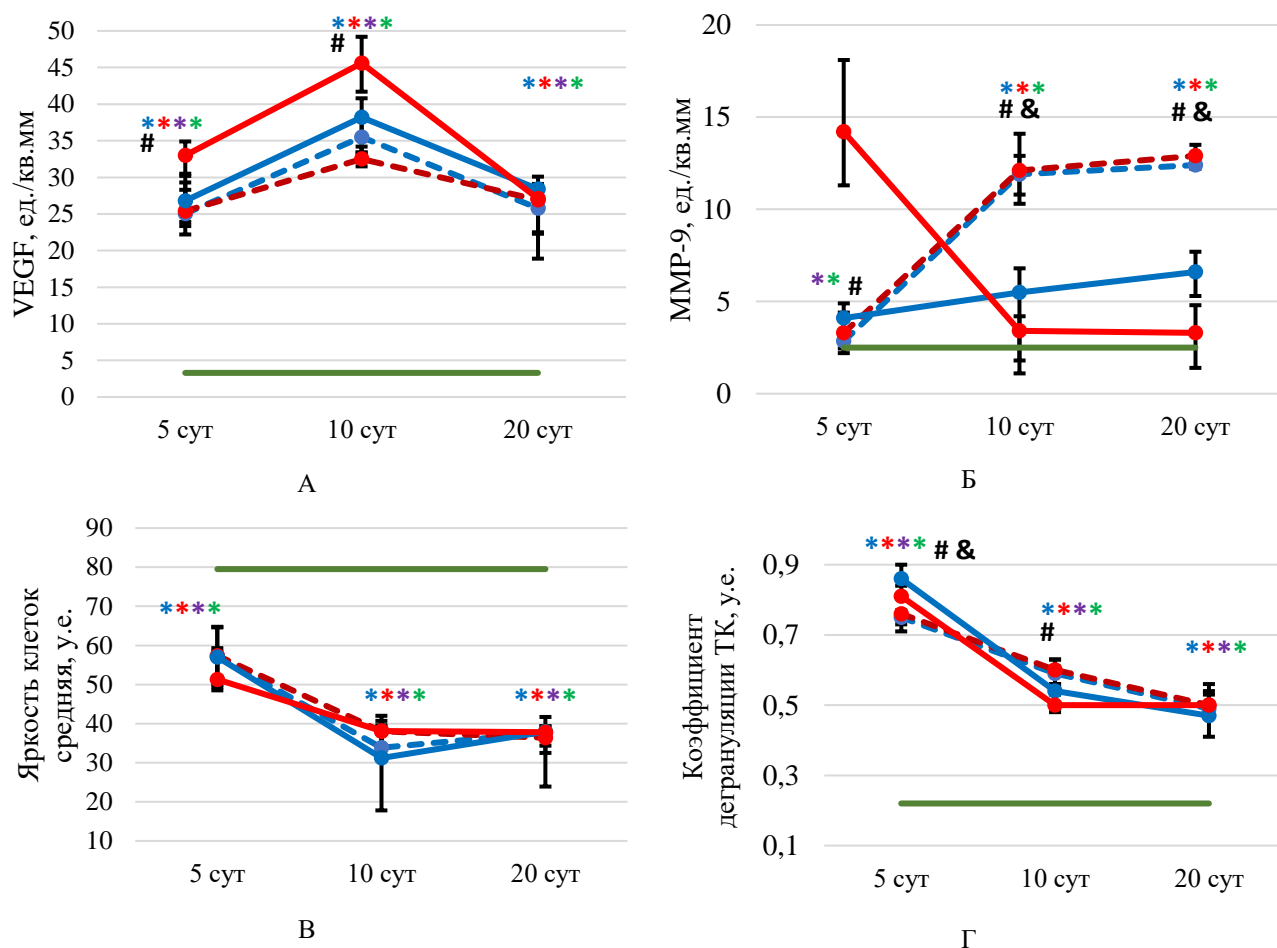
Комплексный анализ метаболитов окислительной деструкции белков и липидов в ране при экспериментальной ТТ (табл. 3) позволил установить, что на 5, 10, 20 сутки наблюдения происходит накопление вторичных и конечных продуктов ПОЛ, экстрагируемых в гептановую фазу, и преимущественно конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе липидного экстракта. При экспериментальной ТТ в ожоговой ране увеличивается суммарное содержание продуктов ОМБ в спонтанном режиме на 5, 10, 20 сутки за счет ранних (АДНФГ) продуктов нейтрального характера (детекция в ультрафиолетовом спектре) на 5, 10, 20 сутки, ранних и поздних (КДНФГ) продуктов основного характера (детекция в видимом спектре) на 20 сутки, поздних продуктов нейтрального характера на 10 и 20 сутки. В индуцированном режиме содержание продуктов ОМБ в ожоговой ране на 5, 10, 20 сутки ТТ увеличивается за счет ранних и поздних производных ОМБ основного и нейтрального характера.

На 5 и 20 сутки экспериментальной ТТ увеличивается резервно-адаптационный потенциал в ожоговой ране, рассчитываемый по содержанию продуктов ОМБ. Накопление продуктов ПОЛ и ОМБ в ожоговой ране является отражением избыточной генерации свободных радикалов активированными нейтрофилами, моноцитами/макрофагами, эндотелиоцитами и/или снижения активности систем антиокислительной защиты, а также демонстрируют роль изменений редокс-статуса ожоговой раны в патогенезе ТТ, являются основой для проведения дальнейших исследований по изучению процессов СРО в коже в клинических условиях у больных с ожогами для обозначения продуктов ПОЛ и ОМБ в качестве диагностических биомаркеров и предикторов осложнений, а также показателей эффективности и мишеней проводимой терапии (Mitrani M.I. et al., 2019; Samuel T.J. et al., 2019; Pérez-Sala D. et al., 2019; Hawkins C.L. et al., 2019).

При экспериментальной ТТ в крови на 5 и 10 сутки увеличивается абсолютное количество нейтрофилов, моноцитов. При исследовании функциональной активности нейтрофилов крови выявлено повышение поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов (рис. 2), увеличение концентрации в сыворотке С-РБ. Изменения адаптивного иммунитета после ТТ включали в крови на 5 и 10 сутки наблюдения снижение абсолютного общего количества лимфоцитов, количества CD3<sup>+</sup>, на 5, 10 и 20 сутки снижение CD45RA<sup>+</sup> лимфоцитов (рис. 3). Патогенез снижения количества лимфоцитов в крови при ТТ включает ограничение лимфоцитопозеза, активацию гибели лимфоцитов в условиях увеличения продукции TNF- $\alpha$ , изменения кислотно-основного состояния и др. факторов. На 5, 10 и 20 сутки ТТ в крови установлено увеличение количества лимфоцитов с признаками раннего апоптоза, позднего апоптоза и некроза. При ТТ в сыворотке снижается концентрация Ig G на 5 и 10 сутки, что может

быть обусловлено как снижением количества CD45RA<sup>+</sup> лимфоцитов, т.е. преимущественно В-лимфоцитов и как следствие плазмоцитов, так и потерей плазменных белков в ходе экссудации в очаг повреждения. Изменение регуляции иммунного ответа при экспериментальной ТТ презентуется возрастанием концентрации в сыворотке TNF- $\alpha$  и IL-4 на 5, 10 и 20 сутки ТТ

Роль изменений исследуемых показателей при экспериментальной ТТ в патогенезе ТТ представлена на рис. 4.



—•—•— Группа 2 ТТ+АсП —•—•— Группа 3 ТТ+ДП —•—•— Группа 5 ТТ+МТ —•—•— Группа 4 ТТ+МТ ДП —•—•— Группа 1  
 \* – значимые ( $p < 0,01$ ) различия с группой 1 (\* группы 2, \* группы 3, \* группы 4, \* группы 5);  
 # – в группе 4 по сравнению с группой 3; & – в группе 5 по сравнению с группой 2

Рисунок 1 – Динамика экспрессии VEGF и MMP-9, показатели тучных клеток в очаге ТТ в исследуемых группах (Me (Q25; Q75)). А – экспрессия VEGF. Б – экспрессия MMP-9. В – средняя яркость клеток. Г – количество дегранулировавших клеток

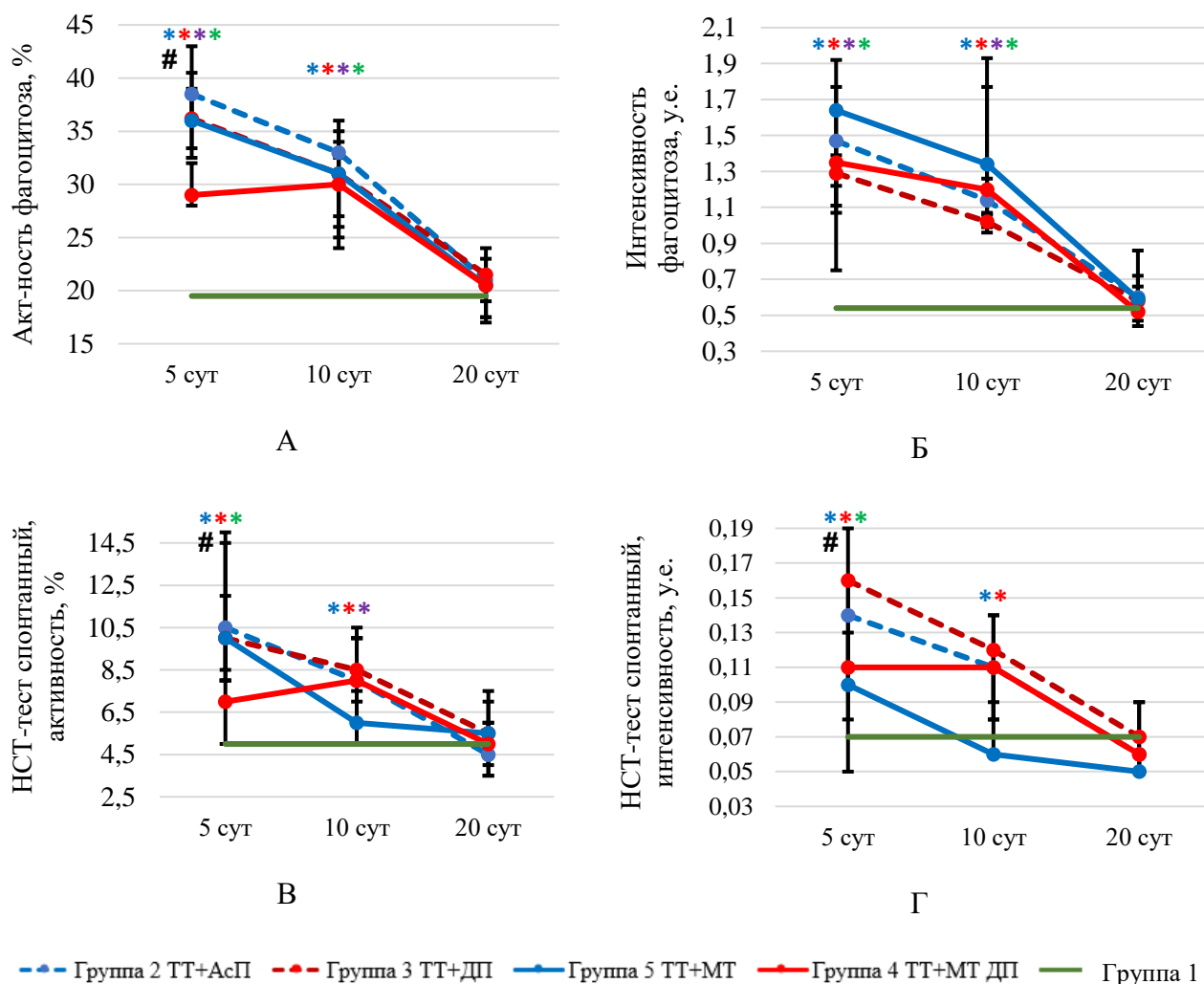
Локальное применение МТ при экспериментальной ТТ приводит к ускорению заживления ожоговой раны (табл. 2). На 5, 10 и 20 сутки наблюдения увеличивалась скорость эпителизации, уменьшалась площадь ожоговой раны, к 20 суткам она составила 54% от исходной площади (в группе животных с ТТ и применением только асептической повязки - 65%). В очаге ТТ

снижалось содержание нейтрофилов на 5 и 10 сутки, гистиоцитов – на 5, 10 и 20 сутки, увеличивалось содержание лимфоцитов на 5 и 10 сутки, фибробластов – на 5, 10 и 20 сутки.

Протекторный, ускоряющий заживление эффект МТ в очаге ТТ обусловлен мультитропными свойствами и обеспечивается несколькими механизмами (Rahbarghazi A. et al., 2021). Установлено, что МТ влияет на содержание в ожоговой ране факторов, принимающих непосредственное участие в репарации: экспрессия MMP-9 увеличивалась на 5 сутки и снижалась на 10 и 20 сутки ТТ, экспрессия VEGF увеличивалась на 5 и 10 сутки (рис. 1). Несмотря на то, что большинство исследований сосредоточено на антиангиогенном потенциале МТ в контексте онкостатического действия, считают, что МТ является «smart»-гормоном: может подавлять или инициировать ангиогенез через различные сигнальные пути дозо- и контекстнозависимым образом, ведущие к различным биологическим исходам (Xu Y., 2020; Yang L. et al., 2019; González A. et al., 2021).

Локальное применение МТ при ТТ неоднозначно изменяет количество и активность тучных клеток в очаге. В ожоговой ране общее количество и дегрануляция тучных клеток увеличивались на 5 и 10 сутки, снижались на 20 сутки ТТ (рис. 1). По всей видимости, МТ рецептор-зависимым образом вмешивается в метаболизм и активность тучных клеток и тем самым оказывает регуляторное влияние на течение воспалительного процесса, репарации после ТТ за счет изменения синтеза и секреции тучными клетками аутокоидов, ферментов, цитокинов, факторов роста, АФК. Кроме того, активированные тучные клетки сами синтезируют МТ с последующим ауто- и паракринным влиянием (Chen H. et al., 1998).

Применение МТ в составе ДП при экспериментальной ТТ приводит к снижению и частичному восстановлению содержания преимущественно вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой фазе экстракта ожоговой раны на 10 и 20 сутки, в изопропанольной фазе на 5, 10 и 20 сутки ТТ (табл. 3). В ожоговой ране снижается суммарное содержание продуктов ОМБ в спонтанном режиме на 5 сутки за счет ранних продуктов нейтрального характера, на 10 и 20 сутки за счет ранних и поздних продуктов нейтрального характера, в индуцированном режиме на 5 сутки за счет ранних продуктов нейтрального и основного характера, на 20 сутки – за счет ранних и поздних продуктов нейтрального и основного характера. На 10 сутки в ожоговой ране содержание продуктов ОМБ в индуцированном режиме повышается преимущественно за счет поздних продуктов нейтрального и основного характера. Резервно-адаптационный потенциал ожоговой раны, оцениваемый по продуктам ОМБ, повышается на 10 сутки, снижается на 20 сутки ТТ.

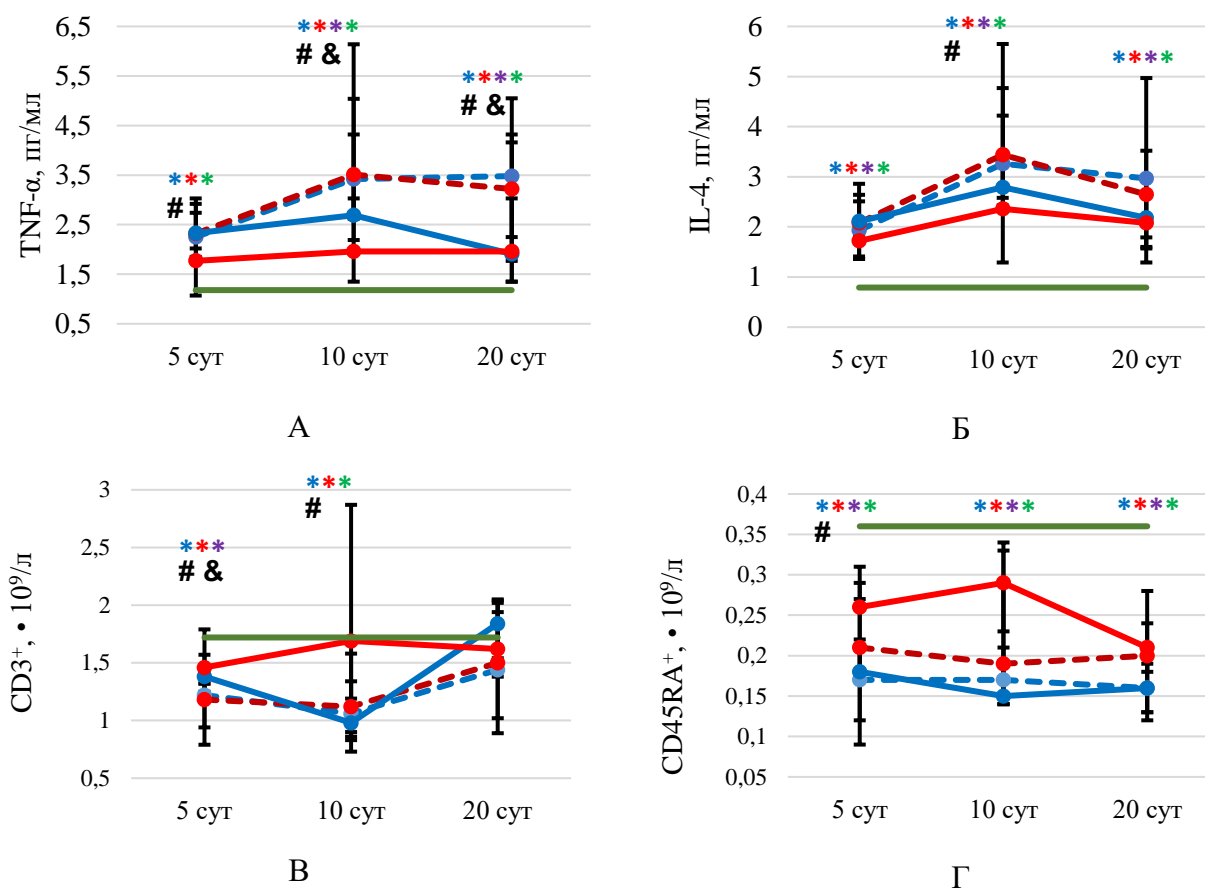


\* – значимые ( $p < 0,01$ ) различия с группой 1 (\* группы 2, \* группы 3, \* группы 4, \* группы 5); # – в группе 4 по сравнению с группой 3; & – в группе 5 по сравнению с группой 2

Рисунок 2 – Динамика показателей функциональной активности нейтрофилов в исследуемых группах (Me (Q25; Q75)). А – активность фагоцитоза. Б – интенсивность фагоцитоза. В – НСТ-тест индуцированный, активность. Г – НСТ-тест индуцированный, интенсивность

Показано, что при повреждениях кожи МТ концентрируется в эпидермисе (Janjetovic Z. et al., 2017). Прямой антиоксидантный эффект МТ при ТТ может быть обусловлен взаимодействием с гидроксильным и пероксильным радикалами, нерадикальными окислителями, включая перекись водорода, синглетный кислород и пероксинитрит, хелатирования металлов переменной валентности, таких как медь, железо (Chitimus D.M. et al., 2020). МТ может связывать АФК и ингибировать их генерацию путем активации цитозольной флавопротеинхинонредуктазы II (NQO2) (Rusanova I. et al., 2019). Опосредованные антиоксидантные эффекты МТ включают стабилизацию мембранного потенциала и регуляцию биоэнергетики митохондрий, снижение активности прооксидантных ферментов (Huo X. et al., 2017; Mayo J.C. et al., 2017).

Принципиальным в метаболизме клеток при воспалении является гликолитическое, блокирующее эффект Варбурга, действие МТ (Reiter R.J. et al., 2021).



— Группа 2 ТТ+АсП — Группа 3 ТТ+ДП — Группа 5 ТТ+МТ — Группа 4 ТТ+МТ ДП — Группа 1

\* – значимые ( $p < 0,01$ ) различия с группой 1 (\* группы 2, \* группы 3, \* группы 4, \* группы 5);  
# – в группе 4 по сравнению с группой 3; & – в группе 5 по сравнению с группой 2

Рисунок 3 – Динамика показателей иммунного статуса в исследуемых группах (Me (Q25; Q75)).  
А – динамика концентрация TNF- $\alpha$ . Б – концентрация IL-4. В – содержание CD3<sup>+</sup> лимфоцитов.  
Г – содержание CD45RA<sup>+</sup> лимфоцитов

С использованием корреляционного анализа продемонстрировано, что площадь ожоговой раны при экспериментальной ТТ в условиях локального применения МТ сокращается по мере увеличения дегрануляции тучных клеток на 5 сутки, повышения экспрессии VEGF на 5 и 10 сутки, снижения экспрессии MMP-9 на 10 и 20 сутки ТТ. Установлено наличие ассоциации между площадью ожога и содержанием в ожоговой ране вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта, суммарным содержанием продуктов ОМБ, содержанием ранних и поздних нейтрального характера продуктов ОМБ.



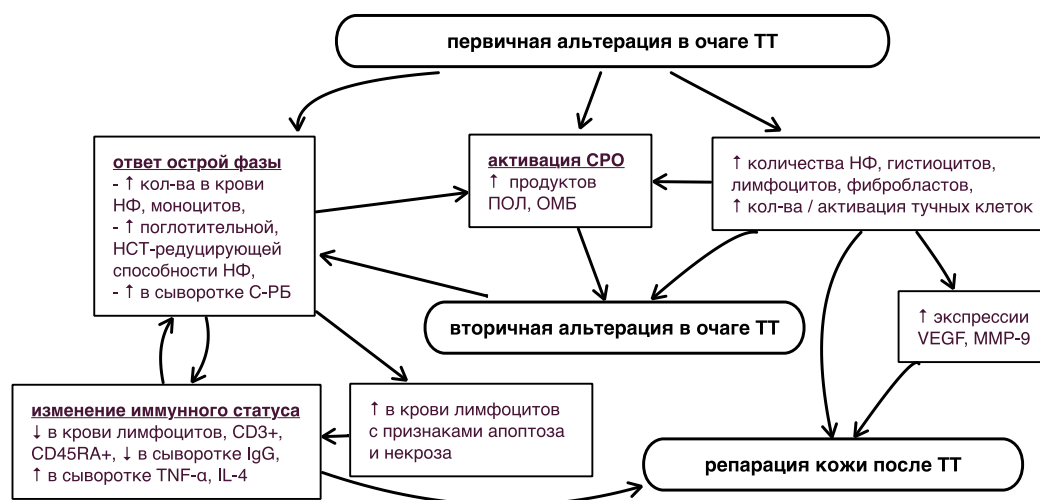


Рисунок 4 – Роль изменений клеточного состава, СРО в очаге повреждения, иммунного статуса в крови в патогенезе ТТ

Применение МТ в составе ДП при экспериментальной ТТ приводит к изменению показателей ответа острой фазы и иммунного статуса в крови: снижению количества сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов на 5 сутки, повышению и частичному восстановлению количества в крови лимфоцитов, в том числе  $CD3^+$  и  $CD45RA^+$  лимфоцитов на 5 и 10 сутки (рис. 3). НСТ-редуцирующая способность нейтрофилов крови снижается и полностью восстанавливается на 5 сутки (рис. 2). Концентрация в сыворотке  $TNF-\alpha$  снижается на 5, 10 и 20 сутки, концентрация  $IL-4$  снижается на 10 сутки эксперимента. В сыворотке концентрация С-РБ снижается на 5 и 10 сутки. Количество в крови лимфоцитов с признаками раннего апоптоза снижается на 5, 10 и 20 сутки, количество в крови лимфоцитов с признаками позднего апоптоза, признаками некроза снижается на 5 сутки. В сыворотке повышается концентрация  $IgG$  на 5 и 10 сутки экспериментальной ТТ.

Системное применение МТ при экспериментальной ТТ приводит к уменьшению абсолютной и относительной площади ожоговой раны на 20 сутки (к 20 суткам площадь составила 52% от исходной), увеличению скорости ее эпителизации на 10 и 20 сутки. В ожоговой ране снижалось количество нейтрофилов на 5 и 10 сутки, гистиоцитов – на 10 и 20 сутки, повышалось представительство лимфоцитов и фибробластов на 5 и 10 сутки (табл. 2); увеличивалось общее количество и дегрануляция тучных клеток на 5 сутки, снижалось общее число и дегрануляция тучных клеток на 10 и 20 сутки ТТ (рис. 1). При иммуногистохимическом исследовании снижалась экспрессия  $MMP-9$  на 10 и 20 сутки ТТ.

Внутрибрюшинное применение МТ у крыс при ТТ приводит к снижению содержания в ожоговой ране преимущественно конечных продуктов ПОЛ в гептановой фазе, первичных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе на 5, 10 и 20 сутки, вторичных и конечных продуктов

ПОЛ в изопропанольной фазе на 5 и 20 сутки (табл. 3). В очаге повреждения снижалось и частично восстанавливалось при оценке в спонтанном режиме суммарное количество продуктов ОМБ на 5, 10 и 20 сутки преимущественно за счет ранних и поздних продуктов нейтрального характера. В металл-индуцированном режиме в ожоговой ране снижалось и полностью на 5 сутки, частично на 20 сутки восстанавливалось содержание ранних и поздних продуктов ОМБ нейтрального и основного характера.

Оценка иммунного статуса при экспериментальной ТТ в условиях внутрибрюшинного применения МТ позволила установить увеличение количества в крови лимфоцитов, в том числе CD3<sup>+</sup>, снижение количества в крови лимфоцитов с признаками апоптоза и некроза на 5 сутки (рис. 3), восстановление спонтанной НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов на 10 сутки (рис. 2), снижение концентрации в сыворотке TNF-а на 10 и 20 сутки, концентрации С-РБ – на 5 сутки, увеличение концентрации в сыворотке Ig G на 5 и 10 сутки.

Предполагаемые механизмы протекторного действия МТ при экспериментальной ТТ с учетом полученных нами результатов представлены на интегральной схеме (рис. 5). Применение МТ при ТТ приводит к изменению синтеза и/или секреции факторов, участвующих в репарации кожи после ТТ, в частности повышению содержания в очаге VEGF, снижению содержания MMP-9. Нами установлено изменение (увеличение на 5 и 10 сутки, снижение на 20 сутки) количества и активности по дегрануляции тучных клеток в динамике ТТ, что может иметь значение в экспрессии VEGF и MMP-9 в очаге ТТ. Кроме этого, тучные клетки через изменение активности фагоцитирующих клеток, эндотелиоцитов могут вмешиваться в редокс-статус ожоговой раны и выраженность реакций воспалительной фазы ТТ. Отражением прямого или опосредованного антиоксидантного эффекта МТ является снижение содержания в ожоговой ране продуктов окислительной деструкции липидов и белков. Наконец, противовоспалительный эффект МТ, реализуемый, в частности, за счет снижения синтеза и секреции TNF-а, с одной стороны, уменьшает выраженность ответа острой фазы по данным концентрации С-РБ в сыворотке, количества и функциональной активности нейтрофилов в крови, снижения представительства нейтрофилов в очаге, с другой стороны, имеет значение в уменьшении гибели лимфоцитов в крови, восстановлении их количественного состава в крови и как следствие увеличения их количества в очаге повреждения. Все отмеченные эффекты МТ (влияние на синтез и секрецию факторов репарации, модуляция количества и дегрануляции тучных клеток, антиоксидантный и противовоспалительный) имеют значение в эффективной реализации репарации в очаге ТТ, ускоряют заживление ожоговой раны и снижают выраженность системных проявлений.

Таблица 2 – Влияние МТ на показатели репарации и клеточный состав очага повреждения при экспериментальной ТТ (Ме (Q25; Q75))

Показатели	Группа 2 ТТ+АсП			Группа 3 ТТ+ДП			Группа 4 ТТ+МТ ДП			Группа 5 ТТ+МТ		
	5 сутки	10 Сутки	20 сутки	5 сутки	10 сутки	20 сутки	5 сутки	10 сутки	20 сутки	5 сутки	10 сутки	20 Сутки
Площадь ожога, см <sup>2</sup>	11,66 (11,50; 11,94)	9,48 (9,28; 9,93) *	7,59 (7,23; 7,84) * **	11,59 (11,00; 11,99)	9,40 (9,22; 9,81)	7,29 (7,01; 7,52)	10,33 (10,17; 10,56) #	8,34 (8,19; 8,51) # &	5,54 (5,24; 5,88) # & &&	10,92 (10,73; 11,03)	9,11 (8,53; 9,50) £	6,27 (6,18; 6,42) ш £ ££
Скорость эпителизации, % / сутки	0,89 (0,86; 0,89)	1,90 (1,88; 1,95) *	2,26 (2,14; 2,55) * **	0,91 (0,85; 0,92)	2,01 (1,93; 2,05)	3,06 (2,73; 3,15)	1,33 (1,29; 1,35) #	6,57 (5,92; 6,93) # &	14,30 (13,38; 15,17) # & &&	1,15 (1,04; 1,22)	2,90 (2,62; 3,27) ш £	8,89 (7,80; 9,90) £ ££
Нейтрофилы, ед./мм <sup>2</sup>	1184,7 (1080,0; 1320,0)	1117,7 (1020,0; 1240,0)	120,0 (100,0; 160,0) * **	1132,6 (1055,0; 1302,0)	1069,7 (1001,0; 1126,0)	117,0 (104,0; 128,0)	384,0 (340,0; 420,0) #	373,9 (220,0; 420,0) #	110,5 (60,0; 160,0)	835,8 (700,0; 920,0) Ц	884,6 (780,0; 1020,0) ш £	128,5 (100,0; 140,0) £ ££
Лимфоциты, ед./мм <sup>2</sup>	282,3 (220,0; 340,0)	131,5 (100,0; 160,0) *	326,9 (260,0; 380,0) * **	277,3 (226,0; 324,0)	135,1 (103,0; 157,0)	321,4 (257,0; 371,0)	1187,8 (1040,0; 1360,0) #	312,8 (240,0; 360,0) #	336,8 (240,0; 380,0)	1003,0 (880,0; 1160,0) ш	303,8 (180,0; 440,0) ш £	251,5 (220,0; 300,0) £ ££
Фибробласты, ед./мм <sup>2</sup>	140,9 (100,0; 160,0)	113,1 (80,0; 140,0)	840,8 (700,0; 940,0) * **	144,2 (109,0; 162,0)	119,4 (85,0; 146,0)	849,7 (752,0; 931,0)	175,2 (140,0; 220,0) #	335,2 (300,0; 380,0) #	973,6 (840,0; 1140,0) #	181,5 (120,0; 220,0) ш	305,8 (180,0; 440,0) ш £	942,3 (440,0; 1240,0) £ ££
Гистиоциты, ед./мм <sup>2</sup>	366,9 (320,0; 420,0)	569,2 (440,0; 640,0) *	667,7 (600,0; 740,0) * **	341,8 (310,0; 405,0)	572,9 (467,0; 630,0)	612,7 (545,0; 668,0)	164,8 (120,0; 200,0) #	290,4 (220,0; 360,0) #	420,8 (340,0; 480,0) #	300,5 (220,0; 380,0)	256,9 (120,0; 340,0) ш £	341,5 (300,0; 360,0) ш ££

Примечание \* – значимые (p<0,01) различия с группой 2 на 5 сутки, \*\* – с группой 2 на 10 сутки, # – с группой 3 на соответствующие сутки, & - с группой 4 на 5 сутки, && - с группой 4 на 10 сутки, ш – с группой 2 на соответствующие сутки в группе 5, £ - с группой 5 на 5 сутки, ££ - с группой 5 на 10 сутки.

Таблица 3 – Влияние МТ на содержание продуктов ПОЛ и ОМБ при экспериментальной ТТ (Ме (Q25; Q75))

Показатели	Группа 1 Интактные	Группа 2 ТТ+АсП			Группа 3 ТТ+ДП			Группа 4 ТТ+МТ ДП			Группа 5 ТТ+МТ		
		5 сутки	10 сутки	20 сутки	5 Сутки	10 сутки	20 сутки	5 сутки	10 Сутки	20 сутки	5 сутки	10 сутки	20 сутки
КД и СТ (г)	0,049 (0,013; 0,088)	0,123 (0,112; 0,141) *	0,115 (0,101; 0,141) *	0,126 (0,092; 0,155) *	0,119 (0,110; 0,138) *	0,117 (0,098; 0,142) *	0,116 (0,093; 0,145) *	0,109 (0,103; 0,161) *	0,095 (0,058; 0,131) * # &	0,086 (0,085; 0,094) * # &	0,134 (0,094; 0,140) *	0,133 (0,086; 0,141) *	0,089 (0,085; 0,095) *ш £ ££
ШО (г)	0 (0; 0,011)	0,018 (0,013; 0,031) *	0,009 (0,003; 0,018) * ^	0,025 (0,015; 0,056) * ^^	0,016 (0,011; 0,029) *	0,008 (0,003; 0,016) *	0,022 (0,012; 0,041) *	0,019 (0,012; 0,028) *	0,004 (0,003; 0,017) * &	0,005 (0,004; 0,006) * # &	0,013 (0,012; 0,014) * ш	0 (0; 0,002) ш	0,002 (0,001; 0,004) ш £ ££
КД и СТ (и)	0,217 (0,209; 0,228)	0,259 (0,200; 0,313) *	0,210 (0,169; 0,264)	0,224 (0,211; 0,263)	0,248 (0,200; 0,311) *	0,208 (0,175; 0,244)	0,218 (0,207; 0,244)	0,214 (0,183; 0,219) #	0,195 (0,165; 0,239)	0,185 (0,171; 0,191) #	0,209 (0,195; 0,228) * ш	0,209 (0,200; 0,220)	0,199 (0,173; 0,213) * ш
ШО (и)	0 (0; 0,011)	0,030 (0,015; 0,04) *	0,007 (0,004; 0,026) * ^	0,034 (0,016; 0,039) * ^^	0,028 (0,012; 0,041) *	0,008 (0,004; 0,021) *	0,031 (0,024; 0,032) *	0,019 (0,016; 0,025) * #	0,004 (0,002; 0,009) * # &	0,006 (0,005; 0,008) * # &	0,009 (0,007; 0,015) * ш	0,007 (0,004; 0,009) *	0,011 (0,009; 0,016) * ш
S ОМБ спонт., у.е./мг белка	47,83 (41,94; 55,40)	66,87 (60,56; 76,11) *	79,30 (62,59; 122,34) * ^	82,04 (55,79; 135,89) * ^	64,70 (59,12; 71,45) *	75,61 (65,12; 82,77) *	79,15 (55,79; 135,89) *	49,97 (41,94; 79,07) #	64,65 (56,91; 76,64) *#	69,87 (66,17; 83,94) * # &	55,79 (51,53; 64,65) * ш	71,03 (67,38; 72,93) * ш £	66,05 (56,70; 74,87) * ш ££
S АДНФГ спонт., у.е./мг белка	38,54 (30,64; 41,39)	59,19 (52,29; 62,31) *	65,04 (54,51; 96,45) *	65,04 (42,19; 97,89) *	56,18 (51,75; 63,16) *	62,07 (55,45; 76,82) *	63,25 (52,79; 74,46) *	40,77 (35,11; 64,89) #	57,90 (48,93; 64,39) * #	56,15 (54,15; 70,39) * # &	47,78 (42,19; 57,09) * ш	57,71 (54,26; 62,64) * ш £	54,92 (50,75; 65,43) * ш £
S КДНФГ спонт., у.е./мг белка	10,12 (8,23; 11,31)	8,81 (8,09; 10,67)	15,49 (9,56; 26,11) * ^	16,99 (12,18; 33,88) * ^	9,12 (7,85; 18,25)	13,57 (10,82; 16,52) *	15,87 (13,17; 24,92) *	10,28 (8,23; 18,01)	8,97 (6,76; 13,15) # &	13,73 (11,63; 15,34) * # & &&	6,75 (5,05; 8,83) *	13,21 (10,29; 13,88) £	8,74 (5,95; 12,49) ш ££

Примечание \* – значимые (p<0,01) различия с гр. 1, ^ – с гр. 2 на 5 сутки, ^^ – с группой 2 на 10 сутки, # – с группой 3, & - с группой 4 на 5 сутки, && – с группой 4 на 10 сутки, ш – с группой 2 на соответствующие сутки, £ – с группой 5 на 5 сутки, ££ – с группой 5 на 10 сутки.



Рисунок 5 – Предполагаемые механизмы протекторного действия МТ при ТТ

## ВЫВОДЫ

1. При термической травме от 5 к 20 суткам снижается абсолютная площадь ожоговой раны, уменьшается количество нейтрофилов, увеличивается – лимфоцитов, гистиоцитов, фибробластов, общее количество и дегрануляция тучных клеток, экспрессия MMP-9 и VEGF; площадь раны уменьшается по мере увеличения экспрессии MMP-9, VEGF, дегрануляции тучных клеток.
2. В ожоговой ране на 5, 10, 20 сутки накапливаются вторичные и конечные продукты перекисного окисления липидов в гептановой фазе, конечные продукты в изопропанольной фазе, увеличивается суммарное содержание продуктов окислительной модификации белков в спонтанном режиме за счет ранних и поздних продуктов нейтрального характера, в индуцированном режиме за счет ранних и поздних производных основного и нейтрального характера.
3. При термической травме в крови на 5 и 10 сутки увеличивается количество нейтрофилов, моноцитов, поглотительная и НСТ-редуцирующая способности нейтрофилов, концентрация С-РБ; снижается количество  $CD3^+$ , на 5, 10 и 20 сутки снижается количество  $CD45RA^+$ , увеличивается количество лимфоцитов с признаками апоптоза и некроза; концентрация в сыворотке Ig G снижается на 5 и 10 сутки, TNF- $\alpha$  и IL-4 – возрастает на 5, 10 и 20 сутки.
4. Применение мелатонина в составе дермальной пленки при термической травме приводит к ускорению эпителизации и сокращения площади ожоговой раны, снижению содержания в ней нейтрофилов, гистиоцитов, увеличению – лимфоцитов, фибробластов; увеличению тучных

клеток и их дегрануляции на 5 и 10 сутки, снижению – на 20 сутки; увеличению экспрессии MMP-9 на 5 сутки, экспрессии VEGF на 5 и 10 сутки, снижению экспрессии MMP-9 на 10 и 20 сутки.

5. Применение мелатонина в составе дермальной пленки при термической травме сопровождается в ожоговой ране снижением содержания преимущественно вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов в гептановой и в изопропанольной фазах, содержания продуктов окислительной модификации белков за счет ранних и поздних аддуктов нейтрального характера, повышением резервно-адаптационного потенциала на 10 сутки, снижением – на 20 сутки.

6. Установлено при термической травме в условиях применения мелатонина в составе дермальной пленки наличие ассоциации между площадью ожога и экспрессией в ожоговой ране VEGF, MMP-9, содержанием дегранулированных тучных клеток, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта, суммарным, ранних и поздних нейтрального характера содержанием продуктов окислительной модификации белков.

7. Применение при термической травме мелатонина в составе дермальной пленки приводит в крови к снижению количества моноцитов, количества и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов, повышению количества лимфоцитов, в том числе CD3<sup>+</sup> и CD45RA<sup>+</sup>, снижению количества лимфоцитов с признаками апоптоза и некроза, снижению концентрации в сыворотке TNF- $\alpha$ , IL-4, С-РБ, повышению – Ig G.

8. Применение при термической травме мелатонина внутривнутрибрюшинно по сравнению с локальным применением приводит к меньшему сокращению площади ожоговой раны на 10 и 20 сутки, большему количеству в ней нейтрофилов, гистиоцитов, и экспрессии MMP-9, меньшему количеству лимфоцитов и экспрессии VEGF, большему количеству дегранулированных тучных клеток на 5 и 20 сутки, меньшему – на 10 сутки; меньшему содержанию продуктов ПОЛ на 5 сутки, большему – на 10 и 20 сутки; в крови к более выраженному повышению количества моноцитов, количества и функции нейтрофилов, концентрации TNF- $\alpha$ , IL-4, С-РБ, мелатонина, более низкому количеству лимфоцитов, в том числе CD3<sup>+</sup> и CD45RA<sup>+</sup>, концентрации Ig M и Ig G.

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Осиков, М.В. Перспективы локального применения мелатонина для коррекции иммунного статуса при термической травме / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.А. Агеева, А.А. Федосов // **Современные проблемы науки и образования**. – 2020. – № 1. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=29489> (дата обращения: 20.01.2022).

2. Осиков, М.В. Ассоциация показателей репарации в очаге повреждения и иммунного статуса в крови в динамике экспериментальной термической травмы / М.В. Осиков, **А.А. Агеева** // **Южно-Уральский медицинский журнал**. – 2020. - №1. – С. 40-52.
3. Симонян, Е.В. Современные аспекты патофизиологии термической травмы / Е.В. Симонян, М.В. Осиков, **А.А. Агеева**, А.А. Федосов, В.А. Бычковских // **Современные проблемы науки и образования**. – 2020. – № 3.; URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29723> (дата обращения: 05.12.2021).
4. Осиков, М.В. Локальный антиоксидантный эффект оригинальной дермальной пленки с мелатонином при термической травме / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, **А.А. Агеева**, Ю.И. Агеев, А.А. Федосов, А.И. Синицкий // **Вестник РГМУ**. – 2020. – № 6. – С. 108-116. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.070 (дата обращения: 29.11.2020). [**Scopus, Web of Science**].
5. Осиков, М.В. Репарация и морфология очага повреждения при экспериментальной термической травме в условиях локального применения мелатонина / М.В. Осиков, **А.А. Агеева** // **Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Современная патология: опыт, проблемы, перспективы»**. – Самара, 17 декабря 2020 г. – С. – 438-441.
6. Осиков, М.В. Влияние системного применения мелатонина на репарацию и гематологические показатели при экспериментальной термической травме / М.В. Осиков, **А.А. Агеева**, Ю.И. Агеев // **Уральский медицинский журнал**. – 2020. – Т. 195. - №12. – С. 21 – 27. DOI: 10.25694/URMJ.2020.12.12
7. Осиков, М.В. Динамика функциональной активности нейтрофилов крови при экспериментальной термической травме в условиях системного и локального применения мелатонина / М.В. Осиков, **А.А. Агеева**, Ю.И. Агеев, В.А. Ушакова, К.В. Никушкина // **Вестник уральской медицинской академической науки**. – 2020. – Т.17, № 4. – С. 290-298.
8. Осиков, М.В. Локальный ПОЛ-ограничивающий и ускоряющий заживление эффект мелатонина в составе оригинальной трансдермальной пленки при экспериментальной термической травме / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, **А.А. Агеева**, А.И. Синицкий, Ю.И. Агеев // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия**. – 2021. – Т. 65. - № 1. – С. 94-101. – DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.94-101.
9. **Агеева, А.А.** Морфологические аспекты протекторного действия мелатонина при экспериментальной термической травме / **А.А. Агеева**, В.А. Конашов // **Материалы XXVII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2021»**. – Санкт-Петербург, 26 – 27 марта 2021 г. – С. – 20-21.
10. Осиков, М.В. Мелатонин в составе дермальной пленки ограничивает гибель лимфоцитов в крови при экспериментальной термической травме / Осиков М.В., Симонян Е.В., **А.А. Агеева**,

Ю.И. Агеев // **Медицинская иммунология.** – 2021. – Т. 23, № 2. – С. 389-394. DOI: 10.15789/1563-0625-MIT-2158. [Scopus].

11. Осиков, М.В. Цитокиновый профиль в крови и репарация в очаге повреждения в динамике экспериментальной термической травмы в условиях локального или системного применения мелатонина / М.В. Осиков, А.А. Агеева, В.А. Ушакова // **Медицинская иммунология.** – 2021. – Т. 23, № 4. – С. 693-698. [Scopus].

12. Агеева А.А., Осиков М.В., Симонян Е.В., Топорец Т.А., Потехина Е.А. Средство в виде пленки лекарственной, содержащей мелатонин, для лечения термической травмы. Пат. № 2751048. Заявка: 2020118766, 29.05.2020. Дата регистрации 07.07.2021 г. Бюл. № 19.

13. Осиков, М.В. Роль тучных клеток в репарации кожи после термической травмы в условиях применения оригинальной дермальной пленки с мелатонином / М.В. Осиков, А.А. Агеева, В.А. Ушакова, А.А. Федосов // **Вестник РГМУ.** – 2021. – № 4. – С. 36-44. DOI: 10.24075/vrgmu.2021.035. [Scopus, Web of Science].

14. Osikov M.V. The effectiveness of local application of melatonin in the original dermal film in experimental thermal trauma / Osikov M.V., Agееva A.A., Ageev Yu.I, Fedosov A.A., Nikushkina K.V., Loginova Yu.V. // **International Journal of Biomedicine.** – 2021. – Vol. 11, № 4. – P. 579-587. [Scopus, Web of Science].

15. Осиков, М.В. Влияние мелатонина в составе оригинальной дермальной пленки на показатели адаптивного иммунитета при экспериментальной термической / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.А. Агеева, К.В. Никушкина // **Российский иммунологический журнал.** – 2021. – Т.24, № 2. – С. 181-188.



**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны  
АФК – активные формы кислорода  
ДК – диеновые конъюгаты  
КД – кетодиены  
СТ – сопряженные триены  
ШО – основания Шиффа  
КДНФГ - кетон-динитрофенилгидразоны  
МДА – метилendiоксиамфетамин  
МТ – мелатонин  
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат  
НФ – нейтрофилы  
НСТ – нитросиний тетразол  
ОМБ – окислительная модификация белков  
ОФС – общая фармакопейная статья  
ПОЛ – перекисное окисление липидов  
СОД – супероксиддисмутаза  
ТТ – термическая травма  
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат (антикоагулянт)  
С-РБ – С-реактивный белок