

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ

ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «ДОНЕЦКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
М. ГОРЬКОГО»

На правах рукописи

НЕЧЕПОРЧУК АНДРЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

УДК 616–001–002.3–06+612.432/.434+612.45+612.826.5

**ОСОБЕННОСТИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ
ИНДИВИДУАЛЬНОЙ РЕАКТИВНОСТИ ОРГАНИЗМА И ЕГО
КОРРЕКЦИЯ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ, ПРОТЕКАЮЩЕЙ
НА ФОНЕ ТУРНИКЕТНОГО ТОКСИКОЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Донецк – 2018

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. По абсолютной величине летальных исходов у лиц молодого, наиболее трудоспособного возраста травматизм выходит на первое место (Гайко П.В. и соавт. 2003; Климовицкий В.Г. и соавт., 2012; Ivanov D.E. et al., 2009). В структуре общего травматизма важное место занимает производственная травма (Танцюра В.П. и соавт., 2013; Черний В.И. и соавт., 2012; Городник Г. А., 2010). Показатели травматизма в угольной промышленности по сравнению с другими отраслями всегда были и остаются самыми высокими как по частоте, так и по тяжести повреждений (Золотухин С.Е. и соавт., 2009; Шпаченко Н.Н. и соавт., 2012). Каждый миллион тон добытого угля уносит жизнь 3-4 шахтеров (Ельский В.Н. и др., 2013). Высокому травматизму горняков способствуют неблагоприятные горно-геологические и санитарно-гигиенические условия труда, а также наличие большой доли устаревшей техники и оборудования на шахтах (Гайко П.В. и соавт. 2010). Наиболее частой травмой в условиях шахтного производства является ЧМТ (Кардаш А.М. и соавт., 2011; Smith H. et al., 2012). Она всегда сопровождается потерей сознания, вынужденным обездвиживанием, а при обрушении породы в это время приводит еще и к сдавлению тела или его частей, что способствует в дальнейшем развитию либо синдрома позиционного сдавления, либо синдрома длительного сдавления (раздавливания, СДР) мягких тканей (Ельский В.Н. и соавт., 2006). При обрушении породы даже кратковременное нарушение сознания препятствует устранению сдавления тканей и оказанию самопомощи пострадавшим. Развившийся СДР утяжеляет любую сопутствующую патологию, в том числе и травму, увеличивает летальность и частоту осложнений травмы во всех периодах травматической болезни (Зяблицев С.В., 2011; Роцин Г.Г. и соавт., 2008).

На сегодняшний день механизмы ЧМТ, развивающиеся на фоне травматического токсикоза, изучены недостаточно. Отсутствуют сведения об особенностях оксидативного стресса, который модифицируется разными факторами ЧМТ, токсемией и индивидуальной реактивности. Недостаточная изученность указанных вопросов патогенеза шахтной травмы препятствует полноценному патогенетическому лечению пострадавших, выбору адекватных и эффективных лекарственных средств для этой коррекции. Эффективность кверцетина, нового отечественного антиоксиданта, при ЧМТ и СДР не исследована. Изучение лечебной эффективности кверцетина при сочетанной ЧМТ и СДР будет способствовать более широкому использованию этого препарата в реанимационной травматологии для

снижения частоты и тяжести неблагоприятных исходов и осложнений у пострадавших.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертационная работа является фрагментом комплексной научно-исследовательской работы "Дисфункція гуморальної регуляції в патогенезі травматичної хвороби" (№ гос. регистрации 0105U008712, шифр темы МК 06.01.05)

Цель и задачи исследования. Цель исследования - определение патогенетической значимости расстройств оксидантно-антиоксидантных отношений при черепно-мозговой травме, протекающей на фоне травматического токсикоза в зависимости от индивидуальной реактивности организма и оценить эффективность его фармакологической коррекции кверцитином.

Задачи исследования:

1. Разработать экспериментальную модель шахтной травмы, обусловленную обрушением горной породы (модель комбинированного повреждения тканей головы и конечностей, их длительного сдавления с последующей декомпрессией) у крыс;
2. Выявить изменения на уровне перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы при ЧМТ и травматическом токсикозе у животных с тремя типами посттравматической реакции (тормозном, промежуточном и возбудимом);
3. Выявить основные закономерности иммунологических нарушений в зависимости от вида ЧМТ, выраженности эндотоксикоза, реактивности организма и определить наиболее значимые мишени для фармакологической коррекции метаболических расстройств на догоспитальном этапе;
4. Оценить лечебную эффективность антиоксиданта кверцитина при сочетанной ЧМТ и уточнить механизм его действия.

Объект исследования – травматическая болезнь головного мозга, осложненная травматическим токсикозом, моделируемые в эксперименте типы посттравматической реакции (возбудимый промежуточный и тормозный).

Предмет исследования – биохимические, иммунологические изменения показателей, которые характеризуют состояние оксидативного стресса, активность иммунологической системы, индивидуальную реактивность, эндотоксемию, эффективность кверцитина.

Методы исследования. В работе использованы физиологические (оценка электропроводности тканей), патофизиологические (моделирование

черепно-мозговой травмы и турникетной токсемии), биохимические (определение в сыворотке крови показателей ПОЛ - ДК, МДА, антиоксидантной системы - α -ТФ, СОД, КАТ, эндогенной интоксикации - МСМ), иммунологические (количество лейкоцитов, лейкоцитарная формула, фагоцитарный индекс и фагоцитарное число, концентрация иммуноглобулинов основных классов - А, G, М), иммуноферментные (определение в крови концентрации ИЛ-1, -2, -4, -6, -8, ФНО- α), статистические.

Научная новизна полученных результатов заключается в установлении неизвестных ранее сторон патогенеза сочетанной ЧМТ и эндотоксикоза, вызванного длительным сдавлением конечностей и в определении лечебной эффективности кверцитина при этой патологии, в том числе в уточнении механизма его влияния на звенья оксидативного стресса, иммунологическую резистентность, структуру цитокинемии. В отношении патогенеза сочетанной ЧМТ впервые установлен механизм оксидантно-антиоксидантных расстройств, нарушений клеточного и гуморального звеньев иммунной системы при возбудимом, промежуточном и тормозном типах посттравматической реакции в динамике. Выявлена зависимость этих нарушений от выраженности системной воспалительной реакции и токсемии. Установлена модулирующая роль индивидуальной реактивности в характере нарушений метаболизма и иммунного ответа организма.

Впервые показано, что кверцитин способен блокировать эффекты эндотоксинов, образуемых при длительном сдавлении мягких тканей.

Практическое значение полученных результатов. Полученные результаты способствуют более полному пониманию механизмов шахтной травмы, роли нарушений ПОЛ, антиоксидантной защиты, функциональной активности иммунной системы, эндотоксемии в воспалительном процессе при сочетанной ЧМТ у шахтеров. Они позволяют при этой патологии обосновать применение и оценить лечебную эффективность кверцитина.

Материалы диссертации внедрены в практику отделений Донецкой областной травматологической больницы, клиник института травматологии и ортопедии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького, Института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака АМН Украины, а также в педагогический процесс на кафедрах патологической физиологии Донецкого и Луганского медицинских университетов.

Личный вклад соискателя. Вклад соискателя в полученные результаты является основным и заключается в проведении патентно-информационного поиска, в анализе литературных данных, в выполнении

всех исследований на животных. Автор самостоятельно моделировал ЧМТ и эндотоксемию, определял физиологические, биохимические и иммунологические показатели. Диссертант также самостоятельно выполнил статистический анализ. Диссертантом написаны самостоятельно все главы диссертации и автореферат, подготовлены для печати статьи и тезисы. Соискателем в настоящем исследовании не были использованы результаты и идеи соавторов публикаций.

Положения, выносимые на защиту.

1. Разработанная нами модель ЧМТ, сочетанная с наложением на бедра крыс турникета, адекватно отражает основные звенья патогенеза одного из видов наиболее частой шахтной травмы. Снятие турникета с бедер крыс приводит к постепенному восстановлению кровотока в конечностях и вымыванию из них токсинов. Такой же механизм эндотоксемии имеет место при освобождении пострадавших из-под завалов в шахте.
2. В начальном периоде изолированной и сочетанной ЧМТ у травмированных животных развивается оксидативный стресс. При возбудимом типе посттравматической реакции имеет место наименьшая, при промежуточном типе средняя, а при тормозном – наибольшая выраженность оксидативного стресса.
3. Иммунологические нарушения при моделируемой травме обусловлены воспалительной реакцией организма. Они развиваются синхронно с оксидативным стрессом. На модели турникета иммунологические нарушения незначительны. При возбудимом типе посттравматической реакции расстройства в иммунной системе выражены умеренно, при промежуточном типе сильнее, а при тормозном – оказываются чрезмерными.
4. Кверцетин при изолированной и сочетанной ЧМТ обладает выраженной лечебной эффективностью: увеличивает продолжительность жизни животных. Кверцетин обладает антиоксидантным, иммуномодулирующим и детоксикационным действием.

Апробация результатов диссертации. Диссертационная работа апробирована на совместном заседании кафедр патологической физиологии, травматологии и ортопедии ГОУ ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького» и отдела экстремальной патологии и прогнозирования Республиканского травматологического центра МЗ ДНР (2018). Основные положения диссертации доложены на научно-практических конференциях с международным участием: «Актуальні

питання медицини: проблеми, гіпотези, дослідження» (Одесса, 2012); «Актуальні проблеми клінічної, експериментальної, профілактичної медицини, стоматології та фармації» (Донецк, 2013). Они также были представлены на XVII Международном медицинском конгрессе студентов и молодых ученых (Тернополь, 2013).

Материалы диссертации также были обсуждены и доложены на научно-медицинских обществах травматологов-ортопедов и патофизиологов (Донецк 2013, 2014, 2018).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, из которых 9 статей в журналах, 1 статья в сборнике, 4 тезисов в материалах научных форумов. 8 работ опубликовано в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, трех разделов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, списка использованной литературы (192 наименования, из которых: 127 отечественных источников, 65 зарубежных источников), приложения. Текстовая часть работы изложена на 121 странице. Диссертация содержит 17 таблиц и иллюстрирована 33 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Экспериментальные исследования выполнены на 254 белых беспородных крысах-самцах весом 250-300 г. Животные содержались на стандартном рационе при свободном доступе к пище и воде в условиях вивария Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького. Подготовка животных к эксперименту, травмирование и выведение из эксперимента осуществляли при соблюдении общих требований и положений Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и других научных целей (Страсбург, 1986) и согласовано с комиссией по биоэтике ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО. Всего выполнено 8 серий экспериментов. Всего выполнено 4 серии экспериментов. Из всего числа животных 224 использованы в четырех основных, 30 – в трех контрольных сериях. Три контрольных серии были необходимы для сравнения биохимических и иммунологических показателей, полученных в основных сериях.

Травму черепа моделировали нанесением одного удара с помощью пружинного ударника под эфирным наркозом. Предварительно череп крысы

фиксируют в специальном устройстве. Сила удара по черепу составляла 1325 Н/см^2 .

При отработке методики моделирования посттравматической реакции все параметры силы и частоты ударов подбирали экспериментально, изучая частоту летальности и исследуя морфологические изменения в области травмы черепа и мозга. На окончательном этапе разработки модели морфологические исследования показали, что при описанном способе моделирования ЧМТ перелома костей черепа не наступает. Вскрытие головного мозга у животных выявляло наличие поднадкостничных, субдуральных, эпидуральных гематом, гематом на основании черепа, участков разможнения мозговой ткани в области удара (коры и височных долей), отека ткани гипофиза. В зоне противоудара – в основании лобных и височных долей мозга имелись повреждения в виде очагов разможнения мозговой ткани и диффузных мелкоочечных кровоизлияний. В целом, травма мозга идентифицировалась как ЧМТ средней и тяжелой степени тяжести.

Летальность в остром периоде ЧМТ (до 1 суток) составила 40,0%. Продолжительность жизни животных при ЧМТ средней степени тяжести лежала в широком интервале значений – от 12 до 75 часов, в среднем $34,5 \pm 3,3$ часа. Для выявления причины такого большого разброса данных, а также учета роли индивидуальной реактивности крыс при ЧМТ применяли методику, связанную с измерением электрокожного сопротивления (Ельский В.Н. и соавт., 2003). Характер повреждений мозга и изменений индивидуальной реактивности животных, определяемый по электрокожной сопротивляемости, лежал в основе определения типов посттравматической реакции и имел важное прогностическое значение. В динамике ЧМТ на основании значений показателя «К» дифференцировали три ее основных типа. Первый тип реакций крыс, погибших на третьи сутки после травмы, назван нами «возбудимым», второй тип реакций крыс, погибших на вторые сутки – «промежуточным», а третий тип реакций крыс, погибших в течение первых суток – «тормозным». В процентном отношении структура распределения типов выглядело соответственно 30:30:40.

Сдавление мягких тканей бедер моделировали путем наложения турникета на область бедер. После фиксации наркотизированных крыс в станке на область верхней трети бедер накладывали из круглой резины турникет. Сдавление мягких тканей бедер осуществляли на протяжении 4 часов (при аварии на глубокой угольной шахте - это среднее время от обрушения породы до освобождения бригадой горноспасателей пострадавшего из под завала).

При моделировании сочетанной травмы – ЧМТ + турникет сначала моделировали ЧМТ по описанному выше способу, а затем накладывали на задние лапы крыс турникет.

В работе использован кверцитин, входящий в состав препарата «Корвитин» (ЗАО НПЦ «Борщаговский химико-фармацевтический завод», Украина). Эффективность кверцитина при разных типах посттравматической реакции при сочетанной ЧМТ определяли по изучению продолжительности жизни крыс (сравнивали с временем жизни травмированных животных соответствующих типов, которым препарат не вводили). В этих сериях препарат вводили внутрибрюшинно однократно. Кверцитин использовали через 0,5 часа после моделирования травмы и сдавления конечностей (в объеме 0,2 – 0,25 мл растворенного в воде для инъекций препарата). Доза кверцитина, равная 200 мг/кг, определена нами на предварительном этапе исследования экспериментально, как максимально эффективная лечебная доза, дающая наибольшую выживаемость животных.

Об интенсивности процессов ПОЛ *in vivo* судили по параллельному определению концентраций гидроперекисей липидов (диеновых конъюгат, ДК) и одного из вторичных продуктов липопероксидации – малонового диальдегида (МДА) (Стальная И.Д., 1977). Антиоксидантную активность ферментативного компонента антиоксидантной системы α -токоферола проводили с помощью фотометрирования хромогенного комплексного соединения Fe^{2+} . Антиоксидантную активность, обусловленную наличием ферментативных систем, определяли по уровню активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Для изучения маркеров эндогенной интоксикации в сыворотке крови определяли молекулы средней массы (МСМ) по методу Габриелян Н. (1979).

Исследования периферической крови (общее количество лейкоцитов и их морфологический состав) проводили унифицированным методом (Долгов В.В., 1995). Для оценки фагоцитарной активности моно- и полинуклеаров использовали метод, основанный на поглощении этими клетками микробов (*Staphilococcus aureus*, штамм 209). В гуморальном звене иммунной системы определяли концентрацию иммуноглобулинов основных классов (Ig A, Ig M, Ig G). Для оценки выраженности воспалительного ответа организма изучали в сыворотке крови концентрацию цитокинов: ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8 и фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α). Указанные цитокины выявляли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением в качестве индикаторного фермента пероксидазы хрена.

Забор крови на исследование осуществляли через 4 часа после моделирования травмы, а в опытах, в которых изучали роль эндотоксемии – через 30 и 60 минут после декомпрессии.

Статистическая обработка результатов исследования была проведена на персональном компьютере под управлением операционной системы Windows XP. Полученные в результате исследования выборки данных были проверены на соответствие законам нормального (Гаусовского) распределения с применением программного пакета Statistica 5.5 для Windows.

Результаты исследования и их обсуждение. На первом этапе исследований выявляли особенности нарушения ПОЛ, АОЗ и эндотоксемии у животных с тремя типами посттравматической реакции при ЧМТ. В первой серии экспериментов использованы крысы, у которых моделировали типы посттравматической реакции, возникавшие при изолированной ЧМТ. Во второй серии определяли эти показатели в компрессионном и декомпрессионном периодах турникета. В третьей серии – при сочетанной ЧМТ в компрессионном и декомпрессионном периодах турникета.

Установлено, что при изолированной и сочетанной ЧМТ развивается оксидативный стресс. При изолированном турникете оксидативный стресс не развивается. Выраженность оксидативного стресса имеет максимальное значение при сочетанной ЧМТ. Она также зависит от индивидуальной реактивности организма, укладываемой в три типа течения посттравматической реакции. При возбудимом типе имеет место меньшая, при промежуточном типе средняя, а при тормозном типе посттравматической реакции наибольшая выраженность оксидативного стресса. Так, при тормозном типе изолированной ЧМТ ДК превышали показатели контроля в 5,7 раза, при промежуточном типе – в 4,7, а при возбудимом – в 1,7 раза ($p < 0,05$). Параллельно уровню ДК изменялись показатели МДА, превышая значения контроля соответственно в 3,5, в 2,6 и в 1,6 раза ($p < 0,05$). Параметры АОС, наоборот, снижались. В наибольшей степени это снижение было представлено при тормозном типе, затем при промежуточном и возбудимом ($p < 0,05$). Из самих показателей АОЗ больше всего снижалась активность СОД, затем уровень α -ТФ и в меньшей мере активность каталазы. Величина МСМ при тормозном типе достигала наивысшей отметки роста в 1,7 раза. При промежуточном типе уровень МСМ превышал контроль на 43% ($p < 0,05$). При возбудимом типе этот уровень не изменялся.

Турникет задних конечностей отягощает течение посттравматической реакции и самой ЧМТ. Показатели ПОЛ, АОЗ и эндотоксемии при

тормозном типе сочетанной ЧМТ представлены на рис. 1. Величина ДК и МДА в компрессионном периоде превышала уровень контроля в 6,9 раза ($p<0,05$) и 2,8 раза ($p<0,05$) соответственно. Концентрация МСМ на 45% превышала контроль ($p<0,05$). После недостоверной тенденции к снижению в раннем декомпрессионном периоде турникета эти показатели снова повышались в позднем периоде турникета ($p<0,05$).

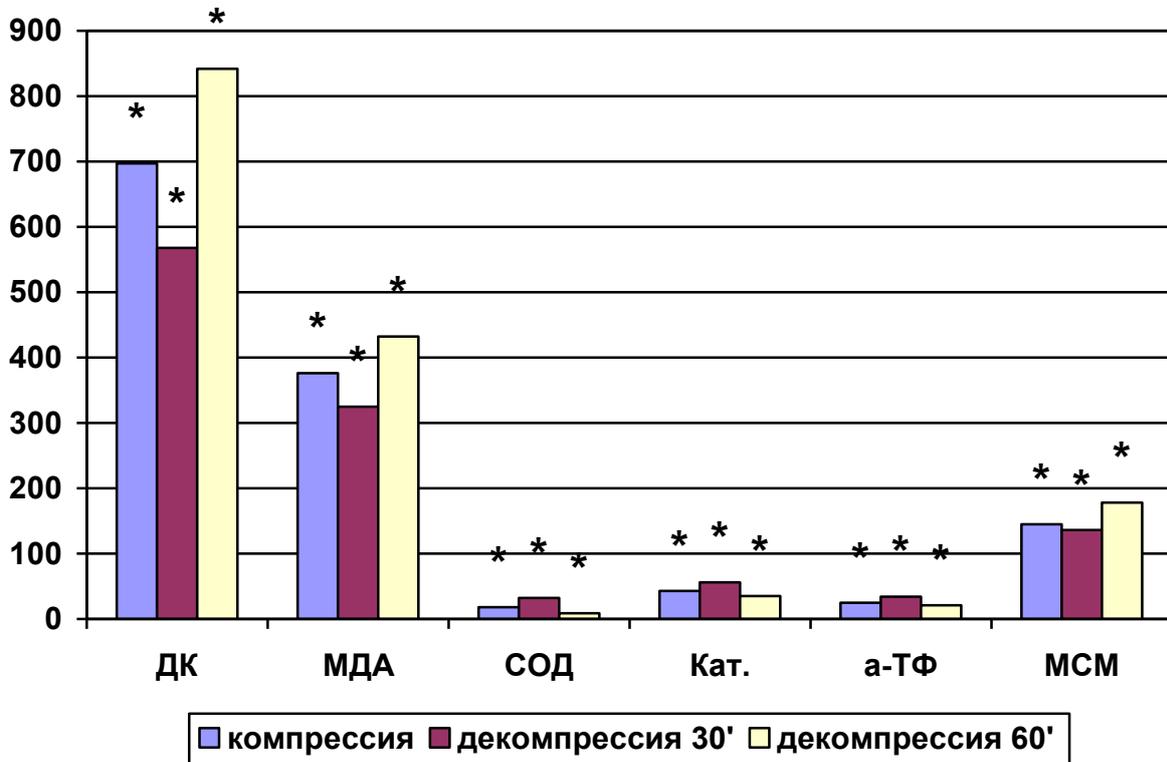


Рис. 1. Изменение показателей оксидативного стресса и эндотоксемии при тормозном типе сочетанной черепно-мозговой травмы в компрессионном и декомпрессионном периодах турникета.

Примечание: * – достоверность по сравнению с контролем ($p<0,05$).

В целом, установлено, что сочетанная ЧМТ характеризуется синдромом взаимного отягощения повреждений. Снятие турникета в раннем декомпрессионном периоде незначительно ослабляет проявления оксидативного стресса, но в позднем периоде проявления оксидативного стресса усиливаются. Выраженность оксидативного стресса коррелирует с продолжительностью жизни травмированных животных. Показатели оксидативного стресса и эндотоксемии характеризуют тяжесть состояния организма и могут быть использованы в качестве ее критериев. Знания о слабых звеньях патогенеза оксидативного стресса позволяют наметить мишени для эффективной фармакотерапии сочетанной ЧМТ.

На втором этапе исследования выявляли особенности иммунологических нарушений у животных с тремя типами посттравматической реакции при изолированной и сочетанной ЧМТ. Установлено, что выраженность иммунологической реакции при турникете, изолированной и сочетанной черепно-мозговой травме зависит от характера травмы, от индивидуальной реактивности животных, а при турникетной травме и сочетанной ЧМТ – от времени декомпрессии.

Выраженность иммунологической реакции при возбудимом типе изолированной ЧМТ носит умеренный характер, сильный при промежуточном и чрезмерный при тормозном типе. Она также коррелирует с продолжительностью жизни травмированных животных. Декомпрессия на начальном (30-ти минутном) этапе существенно не изменяет иммунный ответ. На позднем (60-ти минутном) этапе резко его активизирует. Такой характер иммунологического ответа отражает процесс поступления в кровь токсических веществ из ишемизированных тканей конечностей. Изменения всех иммунологических показателей при сочетанной ЧМТ были выражены сильнее, чем при изолированной травме и турникете. На рис.2. представлены показатели гуморального звена иммунной системы в компрессионном и декомпрессионном периодах турникета у крыс с сочетанной черепно-мозговой травмой при тормозном типе посттравматической реакции. Величина ИЛ-1 β была в 6 раз выше, чем у крыс контроля ($p < 0,05$), ИЛ-2 – в 7 раз ($p < 0,05$). Показатели ИЛ-6 превышали отметку контрольного уровня в 29 раз ($p < 0,05$), ИЛ-8 – в 39 раз ($p < 0,05$), ФНО- α – в 13 раз ($p < 0,05$). Концентрация противовоспалительного цитокина ИЛ-4 была увеличена только в 2 раза ($p < 0,05$). Такой характер нарушения иммунологической защиты организма наглядно отражал характер синдрома взаимного отягощения.

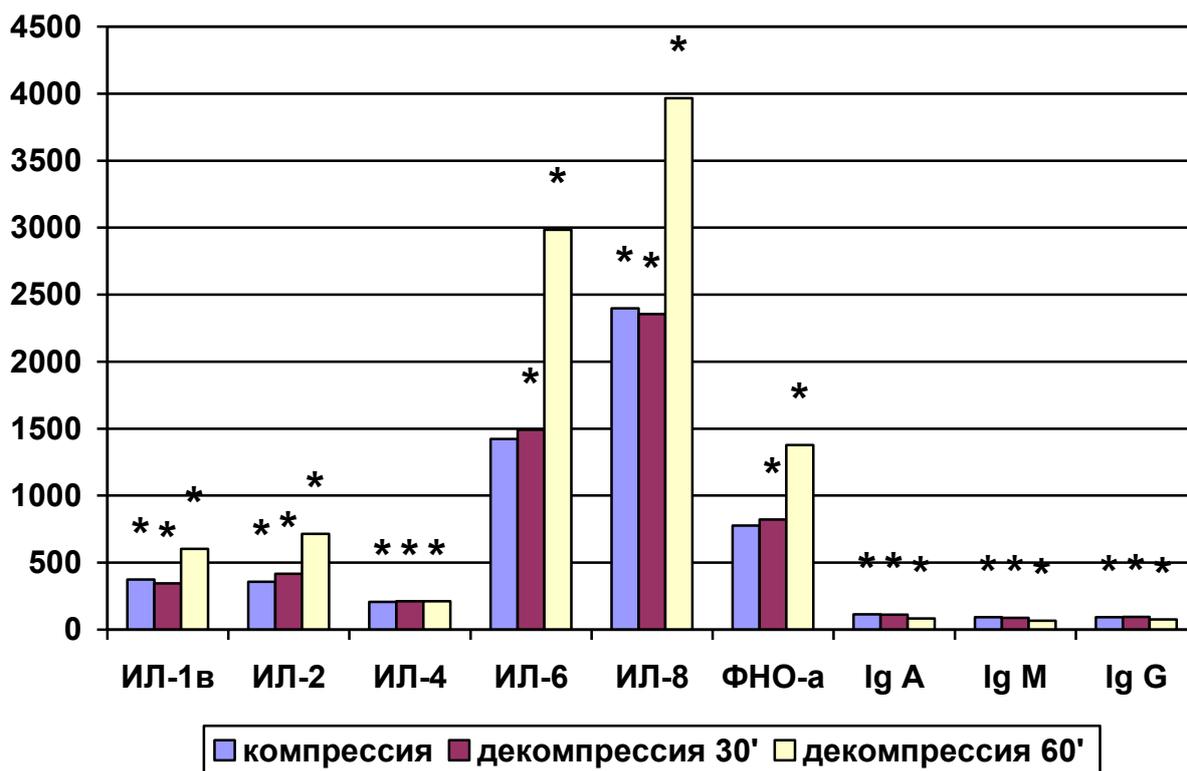


Рис. 2. Изменение показателей гуморального звена иммунной системы в компрессионном и декомпрессионном периодах турникета у крыс с сочетанной черепно-мозговой травмой при тормозном типе посттравматической реакции (%).

Максимальные иммунологические расстройства приходились на поздний декомпрессионный период тормозного типа посттравматической реакции крыс, имеющих сочетанную ЧМТ.

На третьем этапе изучали лечебную эффективность отечественного препарата «Корвитин» (кверцитин) при изолированной и сочетанной ЧМТ.

Поставлено 3 основных серии экспериментов и одна контрольная. В первой основной серии изучали продолжительность жизни крыс и частотное распределение основных типов посттравматической реакции при изолированной и сочетанной ЧМТ после введения кверцитина. Во второй и третьей сериях определяли соответствующие показатели оксидативного стресса и иммунной системы. В контрольной серии изучали продолжительность жизни и частотное распределение типов посттравматической реакции при изолированной и сочетанной ЧМТ.

Установлено, что кверцитин в дозе 200 мг/кг при изолированной и сочетанной травме обладает выраженной лечебной эффективностью, которая заключается в увеличении продолжительности жизни крыс. При

изолированной ЧМТ и тормозном типе посттравматической реакции увеличение продолжительности жизни, по сравнению с контрольной серией животных, составляло 7,3 часа ($p < 0,05$). При сочетанной травме увеличение продолжительности жизни было у крыс с возбудимым типом и промежуточным, превышая продолжительность жизни контрольных крыс на 16,2 и 8,2 часа соответственно ($p < 0,05$). Вместе с увеличением продолжительности жизни крыс, эффективность кверцитина проявлялась в изменении частоты распределения типов посттравматической реакции. Эта частота изменялась только при сочетанной ЧМТ в сторону преобладания развития относительно благоприятного типа посттравматической реакции – возбудимого – на 19% ($p < 0,05$) и в снижении частоты развития относительно неблагоприятного типа посттравматической реакции – тормозного – на 22% ($p < 0,05$).

Иммуномодулирующее действие кверцитина проявлялось как в отношении клеточного, так и в отношении гуморального звеньев иммунной системы. При изолированной ЧМТ и возбудимом типе посттравматической реакции препарат восстанавливал уровень лейкоцитов и лейкоцитарную формулу крови. При других типах посттравматической реакции, в том числе и при сочетанной ЧМТ, препарат уменьшал лейкоцитоз и существенно снижал сдвиг лейкоцитарной формулы крови влево. Выявлено также, что кверцитин положительно влиял на фагоцитоз макрофагов. Во всех случаях изолированной и сочетанной ЧМТ препарат увеличивал поглотительную функцию макрофагов от 50% до 2-х кратной ($p < 0,05$).

Влияние кверцитина на показатели гуморального иммунитета приводило к существенному снижению уровня гиперцитокинемии как при изолированной, так и при сочетанной ЧМТ. Препарат в большей степени воздействовал на уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α . Уровень этих цитокинов при изолированной и сочетанной ЧМТ снижался в 3-12 раз ($p < 0,05$). В меньшей степени изменялась концентрация противовоспалительного цитокина ИЛ-4. На показатели иммуноглобулинов существенного воздействия кверцитин не оказывал. Помимо угнетающего синтез и (или) секрецию провоспалительных цитокинов установлено блокирующее действие кверцитина в отношении эндотоксинов, образующихся в ишемизированных мышцах сдавливаемых турникетом конечностей.

Установлено, что в механизме лечебного действия препарат обладает ярко выраженным антистрессовым и иммуномодулирующим действием. В механизме лечебного действия кверцитина при сочетанной ЧМТ и турникетном сдавлении задних лап крыс лежит выраженное

антиоксидантное действие препарата, направленное на «тушение» свободно-радикального окисления и блокирование эффектов эндотоксемии, вызванной гипоксией тканей и декомпрессией задних конечностей животных.

Полученные данные служат основанием для апробации кверцетина в условиях оказания медицинской помощи горнякам с сочетанной ЧМТ на догоспитальном этапе медицинской эвакуации.

ВЫВОДЫ

В диссертационной работе представлено теоретическое обобщение результатов и достигнуто решение актуальной научной задачи – на основании изучения расстройств оксидантно-антиоксидантных отношений в зависимости от индивидуальных особенностей типа течения посттравматической реакции, развивающейся при черепно-мозговой травме и протекающей на фоне травматического токсикоза, обосновано применение и определена лечебная эффективность коррекции этих нарушений кверцетином.

1. Разработанная нами модель ЧМТ, сочетанная с наложением на бедра крыс турникета, адекватно отражает основные звенья патогенеза одного из видов наиболее частой шахтной травмы. Снятие турникета с бедер крыс приводит к постепенному восстановлению кровотока в конечностях и вымыванию из них токсинов. Такой же механизм эндотоксемии имеет место при освобождении пострадавших из-под завалов в шахте.
2. В начальном периоде изолированной и сочетанной ЧМТ у травмированных животных развивается оксидативный стресс. При возбудимом типе посттравматической реакции имеет место наименьшая, при промежуточном типе средняя, а при тормозном – наибольшая выраженность оксидативного стресса. В частности, при сочетанной ЧМТ и возбудимом типе в компрессионном периоде турникета показатели ПОЛ – ДК и МДА превышают показатели интактных животных соответственно в 2,6 раза ($p < 0,05$) и на 83 % ($p < 0,05$), а при тормозном – в 6,9 и 2,8 раза ($p < 0,05$). Показатели АОЗ – СОД, Кат и α -ТФ при возбудимом типе снижаются в среднем в 2-3 раза ($p < 0,05$), а при тормозном типе – в 2-4 раза ($p < 0,05$). Токсемия в декомпрессионном периоде турникета при всех типах посттравматической реакции через 30 мин ослабляет, а через 60 мин усиливает проявления оксидативного стресса.

3. Иммунологические нарушения при моделируемой травме обусловлены воспалительной реакцией организма. Они развиваются синхронно с оксидативным стрессом. На модели турникета иммунологические нарушения незначительны. При возбудимом типе посттравматической реакции расстройства в иммунной системе выражены умеренно, при промежуточном типе сильнее, а при тормозном – оказываются чрезмерными. Так при возбудимом типе число лейкоцитов превышает значения контроля на 59% ($p < 0,05$), при промежуточном типе в 2,5 раза ($p < 0,05$), при тормозном – в 3 раза ($p < 0,05$). При возбудимом типе концентрация провоспалительных цитокинов – ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α превышает контроль в 7 раз ($p < 0,05$), при промежуточном типе - в 9 раз ($p < 0,05$), при тормозном – в 16 раз ($p < 0,05$). Уровень иммуноглобулинов не изменяется. Токсемия отягощает иммунологические нарушения.
4. Кверцитин в дозе 200 мг/кг при изолированной и сочетанной ЧМТ обладает выраженной лечебной эффективностью. При изолированной ЧМТ кверцитин увеличивает продолжительность жизни животных с тормозным типом на 7,3 часа ($p < 0,05$), увеличивает также частоту возбудимого типа на 16 % ($p < 0,05$), тормозного снижает на 22% ($p < 0,05$). При сочетанной ЧМТ препарат при возбудимом типе увеличивает продолжительность жизни на 16,2 часа ($p < 0,05$), увеличивает также на 19 % ($p < 0,05$) частоту возбудимого типа и снижает на 22% ($p < 0,05$) частоту тормозного типа посттравматической реакции.
5. Кверцитин обладает антиоксидантным, иммуномодулирующим и детоксикационным действием. При возбудимом типе посттравматической реакции сочетанной ЧМТ он уменьшает показатели ПОЛ на 60% ($p < 0,05$), при промежуточном и тормозном типе – в 1,7 – 2,4 раза ($p < 0,05$), показатели АОЗ препарат увеличивает незначительно. Кверцитин при всех типах посттравматической реакции уменьшает лейкоцитоз, в лейкоцитарной формуле уменьшает сдвиг нейтрофилов влево, активизирует поглотительную функцию макрофагов (от 50 % до 2-х кратной величины, $p < 0,05$), снижает гиперцитокинемию. В частности, показатели ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α он уменьшает в 3-12 раз ($p < 0,05$), а на уровень иммуноглобулинов не влияет. При всех типах посттравматической реакции кверцитин проявляет детоксикационные свойства, снижая на 15 – 28 % ($p < 0,05$) уровень МСМ, а также блокируя эффекты ишемических токсинов,

образуемых при декомпрессии в бедрах крыс, что предотвращает гиперцитокинемию.

ПЕРЕЧЕНЬ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Н.Н. Шпаченко. Коррекция оксидативного стресса при ЧМТ кверцетином (экспериментальное исследование) / Н.Н. Шпаченко, А.В. Нечепорчук, Ю.Я. Крюк, С.Е. Золотухин, Е.В. Коваленко // Травматология, ортопедия и военная медицина, 2018. - №1.- С.22-26. *(Диссертант выполнил моделирование травмы, экспериментальную коррекцию)*
2. Крюк Ю. Я. Экспериментальная черепно-мозговая травма и фармакотерапия кверцетином / Ю. Я.Крюк, С. Е. Золотухин, Ю. И. Стрельченко, А. В. Нечепорчук // Университетская клиника. – 2015. – Том 11. – № 2. – С. 47-51 *(Диссертант выполнил моделирование травмы, экспериментальную коррекцию)*.
3. С. В. Зяблицев. Патогенез оксидативных нарушений при сочетанной черепно-мозговой травме и турникетной токсемии в эксперименте / С. В. Зяблицев, А. В. Нечепорчук, Ю. Я. Крюк, С. В. Колесникова // Вестник Казахского национального медицинского университета. – 2013. – № 5 (1). – С. 116-119. *(Диссертант выполнил моделирование травмы, экспериментальную коррекцию, анализ полученных результатов)*
4. Нечепорчук А. В. Эффективность кверцетина при черепно-мозговой травме по данным изменений показателей оксидативного стресса / А. В. Нечепорчук // Питання клінічної і експериментальної медицини. – 2013. – Випуск 17, Том 4. – С. 125-132. *(Диссертант выполнил моделирование травмы, экспериментальную коррекцию)*.
5. Зяблицев С. В. Патогенетическая значимость оксидативных нарушений при сочетанной черепно-мозговой травме и турникетной токсемии / С. В. Зяблицев, Ю. Я. Крюк, С. Е. Золотухин, А. В. Нечепорчук // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2013. – Том 14, № 3. – С. 342-346. *(Диссертант выполнил биохимические исследования)*.
6. Нечепорчук А. В. Эффективность применения кверцетина при черепно-мозговой травме в эксперименте / А. В. Нечепорчук // Загальна

- патологія та патологічна фізіологія. – 2013. – Том 8, № 1. – С. 54-59. *(Диссертант виконав моделювання травми)*
7. Зяблицев С. В. Патогенетическая значимость иммунологических нарушений при сочетанной черепно-мозговой травме и турникетной токсемии / С. В. Зяблицев, Ю. Я. Крюк, С. Е. Золотухин, А. В. Нечепорчук // Патологія. – 2013. – № 3 (29). – С. 56-60. *(Диссертант виконав иммунологические исследования)*.
 8. Золотухин С. Е. Особенности иммунологических нарушений при при сочетанной черепно-мозговой травме и турникетной токсемии / С. Е. Золотухин, А. В. Нечепорчук, Н. Н. Шпаченко, Ю. Я. Крюк, С. В. Попов // Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2013. – Том 13, Випуск 4 (44). – С. 13-19. *(Диссертант виконав иммунологические исследования)*.
 9. Золотухин С. Е. Лечебная эффективность кверцетина при изолированной и сочетанной черепно-мозговой травме в эксперименте / С. Е. Золотухин, А. В. Нечепорчук, Н. Н. Шпаченко, Ю. Я. Крюк // Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2013. – Том 13, Випуск 4 (44). – С. 111-114. *(Диссертант виконав иммунологические исследования)*.
 10. Берест Е.Л. Биохимические критерии доминирования поврежденных при сочетанной нетяжелой черепно-мозговой и челюстно-лицевой травме в эксперименте / Е.Л.Берест, А.В. Нечепорчук, С.Е. Золотухин, А.А. Баешко, Л.П. Линчевская, С.В. Колесникова // Міжнародний вісник медицини. – 2013. – Том 6, №1. - С. 14-17. *(Диссертант виконав биохимические исследования)*.
 11. Берест Е.Л. Доминирования поврежденных при сочетанной нетяжелой черепно-мозговой и челюстно-лицевой травме в эксперименте и их биохимические критерии/ Е.Л.Берест, А.В. Нечепорчук // Актуальні питання медицини: проблеми, гіпотези, дослідження : Міжнародна науково-практична конференція: матеріали. – Одеса, 2012. – С.79 – 82.
 12. Берест Є.Л. Прогнозування гнійно-запальних ускладень при переломах нижньої щелепи на підставі біохімічних показників / Є.Л. Берест, А.В. Нечепорчук // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2012.- №2 (17). – С.161.
 13. Берест Е.Л. Эффективность эрбисола на основании биохимических показателей крови при сочетанной челюстно-мозговой травме в эксперименте / Е.Л. Берест, А.В. Нечепорчук // XVII Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених: матеріали. – Тернопіль, 2013. – С. 228.

14. Берест Е.Л. Прогнозирование гнойно-воспалительных осложнений переломов нижней челюсти при изолированной и сочетанной челюстно-мозговой травме в эксперименте / Е.Л. Берест, А.В. Нечепорчук // Актуальні проблеми клінічної, експериментальної, профілактичної медицини, стоматології та фармації : 75 Міжнародний медичний конгрес молодих всених : матеріали. – Донецьк, 2013. – С. 42.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

α-ТФ	– альфа токоферол
АОЗ	– антиоксидантная защита
ДК	– диеновые конъюгаты
ИЛ	– интерлейкины
ИЛ -1	– интерлейкин-1
ИЛ -2	– интерлейкин-2
ИЛ -4	– интерлейкин-4
ИЛ -6	– интерлейкин-6
ИЛ-8	– интерлейкин-8
ИФА	– иммуноферментный анализ
КАТ	– каталаза
КД	– катепсин Д
МДА	– малоновый диальдегид
МСМ	– молекулы средней массы
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
ПТР	– посттравматическая реакция
СОД	– супероксиддисмутаза
СРО	– свободнорадикальное окисление
ФНО-α	– фактор некроза опухоли-альфа