

М.В. Осиков, А.А. Агеева, Ю.И. Агеев, В.А. Ушакова, К.В. Никушкина

ДИНАМИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ В УСЛОВИЯХ СИСТЕМНОГО И ЛОКАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕЛАТОНИНА

ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Челябинск, Российская Федерация

Резюме. Изменение количественного состава и функциональной активности нейтрофилов (НФ) в крови при термической травме (ТТ) отражает выраженность альтеративных и сосудисто-экссудативных реакций в очаге ожоговой раны, определяет вероятность возникновения локальных и системных осложнений ТТ. Мелатонин (МТ) — регулятор гомеостаза с плеiotропными эффектами, включая антиоксидантный, противовоспалительный, антиапоптогенный и др., что предполагает его протекторное действие при ТТ через изменение активности НФ. **Цель работы** — провести сравнительный анализ влияния МТ при локальном и системном применении на функциональную активность НФ крови в динамике экспериментальной ТТ. **Материалы и методы.** Исследование реализовано на 125 крысах линии Wistar, ТТ моделировали погружением кожи в кипящую воду на 12 с. МТ применяли в первые 5 суток внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг или в составе оригинальной ДП с 0,5 мг/г МТ. На 5, 10 и 20 сутки ТТ исследовали в крови количество НФ, способность НФ поглощать частицы полистирольного латекса, кислородзависимый метаболизм НФ с помощью НСТ-теста. **Результаты и выводы.** Локальное в течение первых 5 суток применение при ТТ ДП с МТ приводит на 5 сутки эксперимента к снижению и частичному восстановлению количества в крови НФ за счет палочкоядерных и сегментоядерных форм, к снижению и частичному восстановлению активности фагоцитоза, снижению и полному восстановлению НСТ-редуцирующей способности НФ крови. Системное в течение первых 5 суток применение при экспериментальной ТТ не приводит к значимому изменению количественного состава, поглотительной и НСТ-редуцирующей способности НФ крови.

Ключевые слова: термическая травма, мелатонин, дермальная пленка, нейтрофилы

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Агеева Анна Алексеевна

anne.ageeva.r@yandex.ru

Дата поступления 08.12.2020 г.

Образец цитирования:

Осиков М.В., Агеева А.А., Агеев Ю.И., Ушакова В.А., Никушкина К.В. Динамика функциональной активности нейтрофилов крови при экспериментальной термической травме в условиях системного и локального применения мелатонина. <http://vestnikural.ru/article/1151> [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2020, Том 17, №4, с. 290–298, DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-4-290-298

Введение

Ежегодно, по данным ВОЗ, более 10 млн человек обращаются за медицинской помощью при ожогах [1]. Самым распространенным (около 80%) видом ожогов является термическая травма (ТТ). Наиболее частыми причинами ТТ являются жидкость и пламя, примерно 2/3 больных ТТ имеют площадь ожога до 10% поверхности тела [2]. Важным для комбустиологии и других смежных специальностей является изучение патофизиологии ожоговой раны для разработки новых подходов ограничения площади вторичной альтерации и закрытия раневого дефекта, борьбы с инфекционными осложнениями и другими неблагоприятными последствиями. В настоящее время для лечения больных с ТТ применяют инфузионную терапию, антибиотики, противовоспалительные, ускоряющие регенерацию и др. средства. Особое внимание с учетом высокой доли пациентов с небольшой площадью поражения уделяется локальной терапии ТТ, в частности, аэрозолям, кремам, гелям, повязкам, дермальным пленкам. Один из ключевых подходов консервативной терапии при ожогах — это создание влажной среды

в ране и оптимальных условий для заживления — может достигаться нанесением на ожоговую поверхность пленочных покрытий, которые в своем составе содержат антисептические, антимикробные, антиоксидантные, стимулирующие репарацию и другие фармакологически активные вещества. Иммунные реакции занимают ключевую позицию в патогенезе ТТ на всех ее этапах. В ответ на термическое повреждение в очаге ТТ высвобождаются медиаторы воспаления, свободные радикалы, активные формы кислорода и азота, которые расширяют зону повреждения, вызывают массивную экссудацию, активацию лейкоцитов и др. [3, 4]. Основные источники активных форм кислорода (АФК) в очаге ТТ — это активированные нейтрофилы (НФ), моноциты/макрофаги, эндотелиоциты с известными системами генерации АФК [5, 6]. Ключевую роль в генерации АФК при ТТ отводят НФ [7]. Особое значение имеет возникновение инфекционных осложнений из-за нарушений барьерной функции кожи, а также дисфункции компонентов иммунной системы. Большинство исследователей констатируют нарушение функции НФ в очаге ТТ, в частности, миграционной способности, фагоцитоза и нетоза, генерации АФК [8, 9]. Дисфункция НФ наиболее выражена после присоединения вторичной инфекции при ТТ [10]. Эндогенным регулятором гомеостаза уделяется особое внимание как потенциальным фармакологическим агентам [11, 12]. Мелатонин (МТ) известен как гормон эпифиза, который является ключевым регулятором циркадного ритма всех живых организмов [13, 14]. Результаты многочисленных исследований влияния МТ на различные ткани и системы организма свидетельствуют о его плеiotропных эффектах. В частности, описаны эффекты МТ на показатели врожденного и адаптивного иммунитета в экспериментальных и клинических условиях, что является предпосылкой для его применения при экспериментальной ТТ [12, 15, 16, 17].

Цель работы: провести сравнительный анализ влияния МТ при локальном и системном применении на функциональную активность НФ крови в динамике экспериментальной ТТ.

Материалы и методы

Работа выполнена на 132 половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 240 ± 20 г, находящихся на стандартном рационе в экспериментально-биологической клинике (виварии) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России при строгом соблюдении требований по уходу и содержанию лабораторных животных, а также выводу их из эксперимента с последующей утилизацией, одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 10 от 15.11.2019) [18, 19]. Животные были случайным образом разделены на 4 группы: группа 1 ($n=26$) — интактный контроль, группа 2 ($n=44$) — животные с ТТ и ежедневным наложением асептической повязки, группа 3 ($n=42$) — животные с ТТ с ежедневным в течение 5 суток наложением оригинальной дермальной пленки (ДП) с МТ и наложением асептической повязки, группа 4 ($n=23$) — животные с ТТ с наложением асептической повязки и внутривентральным введением мелатонина («Flamma SpA», Италия) в ежедневной разовой дозе 10 мг/кг в течение 5 суток. Для моделирования ТТ IIIA степени и относительной площадью 3,5% изолированный межлопаточный участок кожи крысы погружали в очищенную воду при 98–99°C на 12 с. Глубину ожога верифицировали морфологическими методами. ДП с МТ площадью около 12 см² создана на основе натрий карбоксиметилцеллюлозы, содержит МТ в концентрации 0,5 мг/г (заявка на изобретение №2020118766 от 29.05.2020 г.). Для анестезии использовали препарат «Золетил-100» («Virbac SanteAnimale», Франция) в дозе 20 мг/кг. На 5, 10 и 20 сутки от момента индукции ТТ в группах 2, 3 и 4 осуществлялся забор крови под наркозом после торакотомии пункцией сердца в области левого желудочка в вакуумные пробирки «Vacuette» («Greiner Bio-One», Австрия). Гематологические показатели определяли на автоматическом гематологическом анализаторе для ветеринарии, откалиброванном для крыс, «BC-2800Vet» («Mindray», Китай). Лейкоформулу подсчитывали в мазках крови, фиксированных метиловым спиртом и окрашенных азур II-эозином («Гемстандарт-Р», Россия) по Романовскому-Гимзе. НФ из периферической крови выделяли с помощью двойного градиента плотности фикола-верографина (1,077 и 1,092 г/мл). Поглонительную способность НФ крови исследовали с использованием частиц монодисперсного (диаметр 1,7 мкм) полистирольного латекса, учитывая активность, интенсивность фагоцитоза и фагоцитарное число. Кислородзависимый метаболизм НФ крови исследовали, учитывая интенсивность восстановления НСТ в его нерастворимую форму диформозан, оценивали активность и интенсивность спонтанного и индуцированного НСТ-теста, рассчитывали функциональный резерв по активности и интенсивности НСТ-теста. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics v. 19. Характеристика выборок представлена в формате «Me (Q25; Q75)», где Me — медиана, Q25, Q75 — значение нижнего и верхнего квартиля соответственно. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев (Краскела-Уоллиса для множественных сравнений, Манна-Уитни, Вальда-Вольфовитца, Колмогорова-Смирнова для межгрупповых сравнений). Различия между группами считали значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

Результаты оценки количественного состава и функциональной активности НФ крови при экспериментальной

ТТ представлены в табл. 1. На 5-е сутки увеличивается общее количество НФ за счет палочкоядерных и сегментоядерных форм. При оценке поглотительной способности НФ отмечается увеличение активности и интенсивности фагоцитоза, фагоцитарного числа. На 5-е сутки ТТ при оценке кислородзависимого метаболизма НФ крови обнаружено увеличение активности и интенсивности НСТ-теста в спонтанном и индуцированном режимах. На 10-е сутки экспериментальной ТТ в крови увеличивается общее количество НФ, количество палочкоядерных и сегментоядерных НФ. При исследовании функциональной активности НФ крови выявлено увеличение активности и интенсивности фагоцитоза, фагоцитарного числа, активности и интенсивности НСТ-теста в спонтанном режиме. Активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста значимо не отличалась от значений в группе интактных животных. На 20-е сутки ТТ нами не обнаружено значимых изменений количества в крови НФ, в том числе палочкоядерных и сегментоядерных форм, функциональной активности НФ крови по показателям поглотительной и НСТ-редуцирующей способности. Функциональный резерв НФ крови, определяемый по активности и интенсивности НСТ-теста статистически значимо не изменялся на 5-е, 10-е и 20-е сутки ТТ. В динамике ТТ в крови общее количество НФ, количество палочкоядерных и сегментоядерных НФ на 10-е сутки эксперимента значимо ($p<0,01$) ниже, чем на 5-е сутки, на 20-е сутки эксперимента ниже ($p<0,01$), чем на 5-е и 10-е сутки. Активность фагоцитоза на 10-е сутки ТТ значимо ($p<0,01$) ниже, чем на 5-е сутки, активность фагоцитоза, интенсивность фагоцитоза и фагоцитарное число на 20-е сутки эксперимента ниже ($p<0,01$), чем на 5-е и 10-е сутки. Активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста НФ крови на 20-е сутки ТТ ниже ($p<0,01$), чем на 5-е и 10-е сутки, активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста НФ крови на 10-е сутки эксперимента значимо ($p<0,01$) ниже, чем на 5-е сутки, на 20-е сутки ниже ($p<0,01$), чем на 5-е и 10-е сутки.

Таблица 1

Влияние МТ на количественный состав и показатели функциональной активности НФ крови при экспериментальной ТТ (Ме (Q25; Q75))

Показатели	Группа 1 (n=26)	Группа 2			Группа 3			Группа 4		
		5 сутки (n=8)	10 сутки (n=19)	20 сутки (n=14)	5 сутки (n=10)	10 сутки (n=16)	20 сутки (n=16)	5 сутки (n=8)	10 сутки (n=7)	20 сутки (n=8)
НФ, 10 ⁹ /л	1,70 (1,09; 1,88)	2,98 (2,43; 5,39) *	2,58 (1,31; 3,88) *	2,05 (1,27; 2,94)	2,13 (1,84; 2,70)* #	2,21 (1,75; 2,40)	1,58 (1,35; 1,88)	3,15 (2,77; 3,57) *	2,59 (2,35; 2,93) *	2,02 (1,94; 2,71)
ПЯН, 10 ⁹ /л	0 (0; 0,04)	0,207 (0; 0,582) *	0,04 (0; 0,29)*	0	0,07 (0; 0,15)*	0,02 (0; 0,07)	0	0,27 (0,10; 0,32) *	0 (0,04; 0,05)	0,04 (0; 0,06)
СЯН, 10 ⁹ /л	1,65 (1,09; 1,88)	2,78 (2,05; 4,55) *	2,48 (1,31; 3,65) *	2,05 (1,27; 2,94)	2,08 (1,80; 2,55)* #	2,15 (1,65; 2,88)	1,58 (1,35; 1,88)	2,92 (2,52; 3,32) *	2,59 (2,34; 2,90) *	1,99 (1,89; 2,56)
АФ, %	19,50 (17,00; 23,00)	38,50 (32,50; 43,00) *	33,00 (24,00; 36,00) *	21,00 (17,00; 23,00)	29,00 (28,00; 32,00)* #	30,00 (25,00; 32,50) *	20,50 (19,00; 21,00)	36,00 (36,00; 39,00) *	31,00 (26,00; 35,00) *	20,50 (17,50; 21,50)
ИФ, у.е.	0,54 (0,41; 0,62)	1,47 (1,07; 1,92) *	1,14 (0,99; 1,77) *	0,60 (0,47; 0,86)	1,35 (0,75; 1,39) *	1,20 (1,06; 1,26) *	0,52 (0,44; 0,57)	1,64 (1,22; 1,77) *	1,34 (1,06; 1,93) *	0,59 (0,53; 0,66)
ФЧ, у.е.	2,45 (2,20; 3,10)	3,90 (3,30; 4,50) *	3,84 (3,05- 4,90) *	3,18 (2,35; 3,75)	3,75 (3,26; 4,96) *	3,98 (3,57; 4,29) *	2,48 (2,07; 3,07)	4,57 (3,28; 5,53) *	4,08 (3,63; 6,23) *	3,05 (2,52; 3,51)
НСТ-тест сп., акт-ть, %	5,00 (3,00; 7,00)	10,50 (8,00; 14,50) *	8,00 (6,00- 10,00) *	4,50 (4,00; 6,00)	7,00 (5,00; 8,00) #	8,00 (7,50; 10,00) *	5,00 (3,50; 6,00)	10,00 (8,00; 15,00) *	6,00 (5,00; 10,00)	5,50 (3,50; 7,50)
НСТ-тест сп., инт-ть, у.е.	0,07 (0,05; 0,09)	0,14 (0,11; 0,16) *	0,11 (0,08- 0,14) *	0,06 (0,05; 0,09)	0,11 (0,05; 0,11) #	0,11 (0,09; 0,12) *	0,06 (0,05; 0,06)	0,10 (0,08; 0,13) *	0,06 (0,06; 0,11)	0,05 (0,05; 0,06)
НСТ-тест инд., акт-ть, %	9,00 (7,00; 13,00)	16,50 (12,50; 18,50) *	11,00 (8,00- 15,00)	8,50 (6,00; 11,00)	12,00 (10,00; 12,00) #	10,00 (9,00; 10,00)	9,00 (7,50; 10,00)	16,00 (13,00; 18,00) *	9,00 (7,00; 14,00)	8,50 (7,00; 10,00)
НСТ-тест инд., инт-ть, у.е.	0,12 (0,08; 0,17)	0,23 (0,19; 0,26) *	0,15 (0,12- 0,18)	0,11 (0,09; 0,12)	0,13 (0,08; 0,17) #	0,14 (0,12; 0,15)	0,09 (0,05; 0,12)	0,19 (0,18; 0,24) *	0,12 (0,08; 0,18)	0,11 (0,07; 0,12)
ФР (акт-ть НСТ-теста)	1,55 (1,33; 2,00)	1,50 (1,44; 1,65)	1,33 (1,20- 1,67)	2,00 (1,50; 2,67)	1,71 (1,50; 2,00)	1,19 (1,00; 1,33) *	1,83 (1,32; 2,43)	1,46 (1,24; 1,60)	1,50 (0,22; 1,80)	1,70 (1,26; 2,50)
ФР (инт-ть НСТ-теста)	1,80 (1,17; 2,00)	1,54 (1,33; 2,41)	1,27 (0,67- 1,75)	1,75 (1,20; 2,00)	1,54 (1,50; 1,60)	1,43 (0,96; 1,58) *	1,71 (1,48; 2,00)	2,00 (1,46; 2,44)	1,50 (0,88; 2,25)	2,00 (1,50; 2,33)

Примечание. * — значимые ($p<0,01$) различия с группой 1, # — значимые ($p<0,01$) различия с группой 2. НФ — нейтрофилы, ПЯН — палочкоядерные нейтрофилы, СЯН — сегментоядерные нейтрофилы, АФ — активность

фагоцитоза, ИФ — интенсивность фагоцитоза, ФЧ — фагоцитарное число, ФР — функциональный резерв.

При экспериментальной ТТ в условиях применения ДП с МТ на 5 сутки наблюдения в крови снижается общее количество НФ за счет сегментоядерных форм (табл. 1). При оценке функциональной активности НФ выявлено снижение активности фагоцитоза, без значимых изменений интенсивности фагоцитоза и фагоцитарного числа, снижается активность и интенсивность спонтанного и индуцированного НСТ-теста НФ крови. Функциональный резерв НФ, оцениваемый по активности и интенсивности НСТ-теста, значимо не изменяется. Отметим, что в условиях применения ДП с МТ количество в крови НФ, сегментоядерных НФ, активность фагоцитоза значимо отличались ($p < 0,01$) от соответствующих значений в группе интактных животных, а активность и интенсивность спонтанного и индуцированного НСТ-теста НФ крови — значимо не отличались ($p > 0,05$), что позволяет говорить о частичном восстановлении количественного состава и поглотительной способности и полном восстановлении кислородзависимого метаболизма НФ крови при ТТ в условиях применения ДП с МТ. На 10 и 20 сутки нами не обнаружено значимых отличий количественного состава, поглотительной способности, кислородзависимого метаболизма НФ крови при ТТ в условиях применения ДП с МТ по сравнению с группой животных с ТТ. При этом, на 10 сутки количество в крови НФ, палочкоядерных и сегментоядерных НФ не отличались ($p > 0,05$) от значений в группе интактных животных; активность фагоцитоза, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число, активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста НФ крови значимо отличались ($p < 0,01$) от соответствующих значений в группе интактных животных.

При экспериментальной ТТ в условиях системного внутрибрюшинного применения МТ на 5-е, 10-е и 20 сутки наблюдений не обнаружено статистически значимых изменений в крови количественного состава НФ, включая количество палочкоядерных НФ, сегментоядерных НФ, активности фагоцитоза, интенсивности фагоцитоза и фагоцитарного числа, активности и интенсивности спонтанного и индуцированного НСТ-теста НФ крови, функционального резерва НФ крови, определяемого по активности и интенсивности НСТ-теста (табл. 1).

Изменения количественного состава и функциональной активности НФ крови при экспериментальной ТТ отражает известные механизмы и закономерности их участия в реализации воспалительного процесса в ответ на термическое повреждение кожи. Увеличение количества НФ крови обусловлено активацией пролиферации и дифференцировки клеток миелоидного ростка костного мозга в ответ на стимуляцию провоспалительными аутокоидами (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , CSF-G, CSF-GM), а также их демаргинацией в сосудистом русле [20, 21]. Поглотительная и НСТ-редуцирующая способности НФ являются отражением их ключевых функций по захвату и киллингу инфекционных агентов, собственных поврежденных клеток и клеточных компонентов. Увеличение активности и интенсивности фагоцитоза, НСТ-редуцирующей способности отражает активацию НФ в ответ на воздействие провоспалительных медиаторов, синтезируемых в очаге повреждения клетками-участниками воспалительного процесса, моноцитами, лимфоцитами, нейтрофилами, тромбоцитами в крови, эндотелиоцитами [22, 23]. Максимальная выраженность изменений количественного состава и функциональной активности НФ крови при ТТ зафиксирована на 5 и 10 сутки экспериментальной ТТ, что отражает их участие в реализации воспалительного процесса как клеток первой линии обороны.

Полагаем, что выявленный нами при экспериментальной ТТ эффект МТ в составе ДП в виде снижения на 5 сутки количества в крови НФ, их поглотительной и НСТ-редуцирующей способности обусловлен преимущественно антиоксидантным эффектом МТ. Ранее нами продемонстрировано, что применение ДП с МТ при ТТ приводит к снижению содержания продуктов перексидного окисления липидов и окислительной модификации белков в ожоговой ране, уменьшает абсолютную и относительную площадь ожога, увеличивает скорость эпителизации раны [24]. В клетках кожи (кератиноциты, фибробласты, клетки волосяного фолликула, эккринных желез, меланоциты) экспрессируются различные виды рецепторов для МТ [25, 26, 27]. Доказана способность МТ в коже захватывать АФК, его антиоксидантный эффект превышает таковой у аскорбиновой кислоты и токоферола в эквивалентной дозе [28]. МТ в клетках кожи повышает синтез ключевых ферментов антиоксидантной защиты: СОД, каталазы, глутатионпероксидазы и др. [29]. Антиоксидантный эффект МТ приводит к ограничению зоны вторичной альтерации в очаге ТТ, что было показано нами в предыдущих исследованиях в виде уменьшения площади ожоговой раны в динамике ТТ, как следствие снижается синтез провоспалительных медиаторов в очаге ТТ и вторично клетками крови, уменьшается их концентрация в крови и стимулирующее влияние на миелоидный росток костного мозга и циркулирующие в крови НФ. По всей видимости, внутрибрюшинное применение МТ при экспериментальной ТТ и поступление МТ в системный кровоток не оказывает прямого влияния на циркулирующие в крови НФ и пролиферативную активность клеток миелоидного ростка костного мозга. Эффект МТ на количественный состав и функциональную активность НФ крови при ТТ опосредован его вмешательством в редокс-статус ожоговой раны и выраженность деструктивных явлений, опосредующих синтез аутокоидов провоспалительного влияния.

Выводы

1. При экспериментальной ТТ в динамике 20-суточного наблюдения на 5 и 10 сутки увеличивается количество

в крови НФ за счет палочкоядерных и сегментоядерных форм, возрастает поглотительная и НСТ-редуцирующая способности НФ крови без изменения их функционального резерва.

2. Локальное в течение первых 5 суток применение при ТТ ДП с 0,5 мг/г МТ приводит на 5 сутки эксперимента к снижению и частичному восстановлению количества в крови НФ за счет палочкоядерных и сегментоядерных форм, к снижению и частичному восстановлению активности фагоцитоза, снижению и полному восстановлению НСТ-редуцирующей способности НФ крови.

3. Системное в течение первых 5 суток применение при экспериментальной ТТ МТ в суммарной дозе 50 мг/кг не приводит к значимому изменению количественного состава, поглотительной и НСТ-редуцирующей способности НФ крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO Fact Sheet: Burns. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns> (accessed 10 June 2020)
2. Li H., Yao Z., Tan J., Zhou J., Li Y., Wu J., Luo G. Epidemiology and outcome analysis of 6325 burn patients: a five-year retrospective study in a major burn center in Southwest China. *Sci Rep.* 2017; 7: 46066. doi: 10.1038/srep46066.
3. Singer A.J., Boyce S.T. Burn Wound Healing and Tissue Engineering. *J. Burn Care Res.* 2017; 38: e605–e613. doi: 10.1097/BCR.0000000000000538.
4. Korkmaz H.I., Krijnen P.A.J., Ulrich M.M.W., de Jong E., van Zuijlen P.P.M., Niessen H.W.M. The role of complement in the acute phase response after burns. *Burns.* 2017 doi: 10.1016/j.burns.2017.03.007.
5. Jacob S., Herndon D.N., Hawkins H.K., Enkhbaatar P., Cox R.A. Xanthine oxidase contributes to sustained airway epithelial oxidative stress after scald burn. *Int J Burns Trauma.* 2017. 7(6):98-106.
6. Olczyk P., Komosinska-Vassev K., Ramos P., Mencner Ł., Olczyk K., Pilawa B. Application of Numerical Analysis of the Shape of Electron Paramagnetic Resonance Spectra for Determination of the Number of Different Groups of Radicals in the Burn Wounds. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 4683102. doi: 10.1155/2017/4683102.
7. Carter S.R., Chen M.M., Palmer J.L., Wang L., Ramirez L., Plackett T.P., Gamelli R.L., Kovacs E.J. Neutrophil Accumulation in the Small Intestine Contributes to Local Tissue Destruction Following Combined Radiation and Burn Injury. *J Burn Care Res.* 2016; 37 (2): 97-105.
8. Hampson P., Dinsdale R.J., Wearn C.M., Bamford A.L., Bishop J.R., Hazeldine J., Moiemmen N.S., Harrison P., Lord J.M. Neutrophil dysfunction, immature granulocytes, and cell-free DNA are early biomarkers of sepsis in burn-injured patients: A prospective observational cohort study. *Ann. Surg.* 2017; 265: 1241–1249.
9. Devine R.A., Diltz Z., Hall M.W. The systemic immune response to pediatric thermal injury. *Int J Burns Trauma.* 2018; 8 (1): 6-16.
10. Kartchner L.B., Gode C.J., Dunn J.L.M., Glenn L.I., Duncan D.N., Wolfgang M.C. et al. One-hit wonder: Late after burn injury, granulocytes can clear one bacterial infection but cannot control a subsequent infection. *Burns.* 2019; 45 (3): 627-640. doi:10.1016/j.burns.2018.08.019
11. Осиков М.В. Влияние альфа1-кислого гликопротеина на процессы свободнорадикального окисления при экспериментальной печеночной недостаточности. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2007; 144 (7): 29-31.
12. Осиков М.В., Телешева Л.Ф., Агеев Ю.И. Влияние эритропоэтина на апоптоз лимфоцитов при экспериментальной хронической почечной недостаточности. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015; 159 (3): 326-328.
13. Zhao D., Yu Y., Shen Y.D., Liu Q., Zhao Z., Sharma R., Reiter R. J. Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; 10: 249. doi: 10.3389/fendo.2019.00249.
14. Tordjman, S., Chokron S., Delorme R., Charrier A., Bellissant E., Jaafari N., Fougere C. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Curr Neuropsychopharmacol.* 2017; 15 (3): 434-443. doi:10.2174/1570159x14666161228122115
15. Varoni E.M., Soru C., Pluchino R., Intra C., Iriti M. The Impact of Melatonin in Research. *Molecules.* 2016; 21 (2): 240. doi: 10.3390/molecules21020240.
16. Xia Y., Chen S., Zeng S., Zhao Y., Zhu C., Deng B. et al. Melatonin in macrophage biology: Current understanding and future perspectives. *J. Pineal Res.* 2018; 66: e12547. doi: 10.1111/jpi.12547.
17. Осиков М.В., Гизингер О.А., Огнева О.И. Механизм влияния мелатонина на иммунный статус при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения. *Медицинская иммунология.* 2015; 17 (6): 517-524.
18. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. Available at: http://www.bio.msu.ru/res/DOC457/Dir_2010_63_Rus-LASA.pdf (дата обращения: 06.12.2020).

19. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Available at: <https://rm.coe.int/CoERMPublicCommonSearchServices/DisplayDCTMContent?documentId=090000168007a6a8> (дата обращения 06.12.20).
20. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13 (3): 159-175. doi:10.1038/nri3399
21. Liew P.X., Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev.* 2019; 99 (2): 1223-1248. doi:10.1152/physrev.00012.2018
22. Wang J., Arase H. Regulation of immune responses by neutrophils. *Ann N Y Acad Sci.* 2014; 1319: 66-81. doi:10.1111/nyas.12445
23. Rosales C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol.* 2020; 108 (1): 377-396. doi:10.1002/JLB.4MIR0220-574RR
24. Осиков М.В., Симонян Е.В., Агеева А.А., Агеев Ю.И., Федосов А.А., Синицкий А.И. Локальный антиоксидантный эффект оригинальной дермальной пленки с мелатонином при термической травме. *Вестник РГМУ.* 2020; 6. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.070 (дата обращения: 29.11.2020).
25. Janjetovic Z., Jarrett S.G., Lee E.F., Duprey C., Reiter R.J., Slominski A.T. Melatonin and its metabolites protect human melanocytes against UVB-induced damage: Involvement of NRF2-mediated pathways. *Scientific Reports.* 2017; 7 (1): 1274. doi: 10.1038/s41598-017-01305-2.
26. Rusanova I., Martínez-Ruiz L., Florido J., Rodríguez-Santana C., Guerra-Librero A., Acuña-Castroviejo D. et al. Protective Effects of Melatonin on the Skin: Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019; 20 (19): 4948. doi: 10.3390/ijms20194948
27. Dai J., Choo M.K., Park J.M., Fisher D.E. Topical ROR inverse agonists suppress inflammation in mouse models of atopic dermatitis and acute irritant dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology.* 2017; 137: 2523–2531. doi: 10.1016/j.jid.2017.07.819
28. Slominski A.T., Semak I., Fischer T.W., Kim T.K., Kleszczyński K., Hardeland R., Reiter R.J. Metabolism of melatonin in the skin: Why is it important? *Experimental Dermatology.* 2017; 26: 563–568. doi: 10.1111/exd.13208
29. Janjetovic Z., Jarrett S.G., Lee E.F., Duprey C., Reiter R.J., Slominski A.T. Melatonin and its metabolites protect human melanocytes against UVB-induced damage: Involvement of NRF2-mediated pathways. *Scientific Reports.* 2017; 7 (1): 1274. doi: 10.1038/s41598-017-01305-2.

Авторы

Осиков Михаил Владимирович

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии
prof.osikov@yandex.ru

Агеева Анна Алексеевна

Ассистент кафедры патологической физиологии
anne.ageeva.r@yandex.ru

Агеев Юрий Иванович

Кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры патологической физиологии
doctorageev@mail.ru

Ушакова Вера Алексеевна

Кандидат физических наук, доцент кафедры фармации и химии фармацевтического факультета
va-ushakova@yandex.ru

Никушкина Карина Викторовна

Кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник НИИ Иммунологии ЮУГМУ

ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России
Российская Федерация, 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64

DYNAMICS OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF BLOOD NEUTROPHILS IN EXPERIMENTAL THERMAL TRAUMA UNDER CONDITIONS OF SYSTEMIC AND LOCAL USE OF MELATONIN

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Changes in the quantitative composition and functional activity of neutrophils (NF) in the blood during thermal trauma (TT) reflect the severity of alternative and vascular exudative reactions in the focus of a burn wound, and determine the likelihood of local and systemic complications of TT. Melatonin (MT) is a homeostasis regulator with pleiotropic effects, including antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptogenic, and others, which suggests its protective effect in TT through changes in the activity of NF. *The aim of the work* is to conduct a comparative analysis of the effect of MT with local and systemic application on the functional activity of blood neutrophils in the dynamics of experimental TT-implemented. *Materials and methods* the study was conducted on 125 Wistar rats, TT was modeled by skin immersion in boiling water for 12 seconds. MT was used in the first 5 days intraperitoneally at a dose of 10 mg / kg or as part of the original DP with 0.5 mg / g of MT. On days 5, 10, and 20 of TT, the amount of NF in the blood, the ability of NF to absorb polystyrene latex particles, and the oxygen-dependent metabolism of NF were studied using the NBT-test. *Results and conclusions* at TT on days 5 and 10, the amount of NF in the blood increases due to band- and segmentonuclear forms, the absorption and reducing abilities of blood NF increase without changing their functional reserve. Local for the first 5 days of use in TT DP with MT leads on day 5 of the experiment to decrease and partial recovery in the number of blood neutrophils at the expense of band- and segmentonuclear forms, by the decline and partial recovery of the activity of phagocytosis, reduction and the complete restoration of NBT-reducing ability of NF blood. Systemic use during the first 5 days in experimental TT does not lead to a significant change in the quantitative composition, absorption and NBT-reducing ability of blood NF.

Keyword: thermal trauma, melatonin, dermal film, neutrophil

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Anna A. Ageeva

anne.ageeva.r@yandex.ru

Received 08.12.2020

For citation:

Osikov M.V., Ageeva A.A., Ageev Yu.I., Ushakova V.A., Nikushkina K.V. Dynamics of functional activity of blood neutrophils in experimental thermal trauma under conditions of systemic and local use of melatonin. <http://vestnikural.ru/article/1151> [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2020, Vol. 17, no. 4, pp. 290–298. DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-4-290-298 (In Russ)

REFERENCES

1. WHO Fact Sheet: Burns. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns> (accessed 10 June 2020)
2. Li H., Yao Z., Tan J., Zhou J., Li Y., Wu J., Luo G. Epidemiology and outcome analysis of 6325 burn patients: a five-year retrospective study in a major burn center in Southwest China. *Sci Rep.* 2017; 7: 46066. doi: 10.1038/srep46066.
3. Singer A.J., Boyce S.T. Burn Wound Healing and Tissue Engineering. *J. Burn Care Res.* 2017; 38: e605–e613. doi: 10.1097/BCR.0000000000000538.
4. Korkmaz H.I., Krijnen P.A.J., Ulrich M.M.W., de Jong E., van Zuijlen P.P.M., Niessen H.W.M. The role of complement in the acute phase response after burns. *Burns.* 2017 doi: 10.1016/j.burns.2017.03.007.
5. Jacob S., Herndon D.N., Hawkins H.K., Enkhbaatar P., Cox R.A. Xanthine oxidase contributes to sustained airway epithelial oxidative stress after scald burn. *Int J Burns Trauma.* 2017. 7(6):98-106.
6. Olczyk P., Komosinska-Vashev K., Ramos P., Mencner Ł., Olczyk K., Pilawa B. Application of Numerical Analysis of the Shape of Electron Paramagnetic Resonance Spectra for Determination of the Number of Different Groups of Radicals in the Burn Wounds. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 4683102. doi: 10.1155/2017/4683102.
7. Carter S.R., Chen M.M., Palmer J.L., Wang L., Ramirez L., Plackett T.P., Gamelli R.L., Kovacs E.J. Neutrophil

Accumulation in the Small Intestine Contributes to Local Tissue Destruction Following Combined Radiation and Burn Injury. *J Burn Care Res.* 2016; 37 (2): 97-105.

8. Hampson P., Dinsdale R.J., Wearn C.M., Bamford A.L., Bishop J.R., Hazeldine J., Moiemmen N.S., Harrison P., Lord J.M. Neutrophil dysfunction, immature granulocytes, and cell-free DNA are early biomarkers of sepsis in burn-injured patients: A prospective observational cohort study. *Ann. Surg.* 2017; 265: 1241–1249.

9. Devine R.A., Diltz Z., Hall M.W. The systemic immune response to pediatric thermal injury. *Int J Burns Trauma.* 2018; 8 (1): 6-16.

10. Kartchner L.B., Gode C.J., Dunn J.L.M., Glenn L.I., Duncan D.N., Wolfgang M.C. et al. One-hit wonder: Late after burn injury, granulocytes can clear one bacterial infection but cannot control a subsequent infection. *Burns.* 2019; 45 (3): 627-640. doi:10.1016/j.burns.2018.08.019

11. Osikov M.V. Effect of alpha 1-acid glycoprotein on free radical oxidation in experimental liver failure. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2007; 144 (7): 29-31. (in Russ)

12. Osikov M.V., Telesheva L.F., Ageev Yu.I. Effect of erythropoietin on apoptosis of lymphocytes in experimental chronic renal failure. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2015; 3:326-329. (in Russ)

13. Zhao D., Yu Y., Shen Y.D., Liu Q., Zhao Z., Sharma R., Reiter R.J. Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; 10: 249. doi: 10.3389/fendo.2019.00249.

14. Tordjman, S., Chokron S., Delorme R., Charrier A., Bellissant E., Jaafari N., Fougere C. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Curr Neuropharmacol.* 2017; 15 (3): 434-443. doi:10.2174/1570159x14666161228122115

15. Varoni E.M., Soru C., Pluchino R., Intra C., Iriti M. The Impact of Melatonin in Research. *Molecules.* 2016; 21 (2): 240. doi: 10.3390/molecules21020240.

16. Xia Y., Chen S., Zeng S., Zhao Y., Zhu C., Deng B. et al. Melatonin in macrophage biology: Current understanding and future perspectives. *J. Pineal Res.* 2018; 66: e12547. doi: 10.1111/jpi.12547.

17. Osikov M.V., Gizinger O.A., Ogneva O.I. Mechanism of influence of melatonin on the immune status in experimental desynchronization under led illumination. *Meditsinskaya Immunologiya.* 2015; 17 (6): 517-524. (in Russ)

18. Direktiva 2010/63/EU Evropeyskogo parlamenta i Soveta Evropeyskogo Soyuza po okhrane zivotnykh, ispol'zuemykh v nauchnykh tselyakh. Available at: http://www.bio.msu.ru/res/DOC457/Dir_2010_63_Rus-LASA.pdf (accessed at 06.12.2020). (in Russ)

19. Evropeyskaya konventsia o zashchite pozvonochnykh zivotnykh, ispol'zuemykh dlya eksperimentov ili v inykh nauchnykh tselyakh. Available at: <https://rm.coe.int/CoERMPublicCommonSearchServices/DisplayDCTMContent?documentId=090000168007a6a8> (accessed at 06.12.20). (in Russ)

20. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13 (3): 159-175. doi:10.1038/nri3399

21. Liew P.X., Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev.* 2019; 99 (2): 1223-1248. doi:10.1152/physrev.00012.2018

22. Wang J., Arase H. Regulation of immune responses by neutrophils. *Ann N Y Acad Sci.* 2014; 1319: 66-81. doi:10.1111/nyas.12445

23. Rosales C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol.* 2020; 108 (1): 377-396. doi:10.1002/JLB.4MIR0220-574RR

24. Osikov M.V., Simonyan E.V., Ageeva A.A., Ageev Yu.I., Fedosov A.A., Sinitskiy A.I. The influence of parenteral administration of erythropoietin on functional activity of neutrophils of the peripheral blood in experimental thermal injury. *Vestnik RGMU.* 2020; 6. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.070. (in Russ)

25. Janjetovic Z., Jarrett S.G., Lee E.F., Duprey C., Reiter R.J., Slominski A.T. Melatonin and its metabolites protect human melanocytes against UVB-induced damage: Involvement of NRF2-mediated pathways. *Scientific Reports.* 2017; 7 (1): 1274. doi: 10.1038/s41598-017-01305-2.

26. Rusanova I., Martínez-Ruiz L., Florido J., Rodríguez-Santana C., Guerra-Librero A., Acuña-Castroviejo D. et al. Protective Effects of Melatonin on the Skin: Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019; 20 (19): 4948. doi: 10.3390/ijms20194948

27. Dai J., Choo M.K., Park J.M., Fisher D.E. Topical ROR inverse agonists suppress inflammation in mouse models of atopic dermatitis and acute irritant dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology.* 2017; 137: 2523–2531. doi: 10.1016/j.jid.2017.07.819

28. Slominski A.T., Semak I., Fischer T.W., Kim T.K., Kleszczyński K., Hardeland R., Reiter R.J. Metabolism of melatonin in the skin: Why is it important? *Experimental Dermatology.* 2017; 26: 563–568. doi: 10.1111/exd.13208

29. Janjetovic Z., Jarrett S.G., Lee E.F., Duprey C., Reiter R.J., Slominski A.T. Melatonin and its metabolites protect human melanocytes against UVB-induced damage: Involvement of NRF2-mediated pathways. *Scientific Reports.* 2017; 7 (1): 1274. doi: 10.1038/s41598-017-01305-2.

Authors

Mikhail V. Osikov

MD, Professor, head of the Department of Pathological physiology
prof.osikov@yandex.ru

Anna A. Ageeva

Assistant of the Department of Pathological physiology
anne.ageeva.r@yandex.ru

Yuri I. Ageev

PhD, senior lecturer of the Department of Pathological physiology
doctorageev@mail.ru

Vera A. Ushakova

Ph. D., associate Professor of the Department of Pharmacy and chemistry of the faculty of pharmacy
va-ushakova@yandex.ru

Karina V. Nikushkina

PhD, leading researcher at the research Institute of Immunology

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «South-Ural State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
64, Vorovsky str., Chelyabinsk, Russian Federation, 454092