

Limb ischemia-reperfusion and blood loss as factors in the development of pulmonary oxidative stress

Nataliya Volotovska

Andriy Dobrorodnyy

Horbachevsky Ternopil National Medical University
Department of Physiology, Bioethics and Biosafety
Horbachevsky Ternopil National Medical University
Department of Physiology, Bioethics and Biosafety

The lungs are among the organs most sensitive to systemic oxidative stress that develops during blood loss and ischemia-reperfusion syndrome (IRS). Excessive formation of reactive oxygen species (ROS), combined with depletion of antioxidant defenses under acute hypovolemia and trauma, leads to structural damage of lung tissue. However, the effects of combined injuries involving limb ischemia-reperfusion with blood loss or mechanical trauma on oxidative protein modification in the lungs remain poorly understood.

This study investigated oxidative protein modification in lung tissue and quantitative changes in ROS-producing leukocytes in the blood of rats exposed to isolated IRS, blood loss, mechanical trauma, or their combinations. Two hundred sixty male white rats were divided into five experimental groups and a control group. Ischemia was induced by applying a rubber tourniquet for 2 hours, followed by reperfusion. Oxidative protein modification was assessed using 2,4-dinitrophenylhydrazine, and ROS-producing leukocytes were measured by flow cytometry.

Isolated IRS caused an early increase in ROS-producing leukocytes, which intensified by day 3. Blood loss produced an even higher initial rise. The combined models demonstrated the most pronounced and prolonged oxidative imbalance, with a sustained elevation of ROS-producing leukocytes and maximal oxidative protein modification in lung tissue.

These findings indicate that combined injuries involving IRS and blood loss or trauma significantly exacerbate oxidative lung damage, highlighting the importance of targeting oxidative stress in early post-traumatic organ protection.

Key words: lungs; blood loss; ischemia-reperfusion syndrome; trauma; hemostatic tourniquet; protein oxidative modification; reactive oxygen species

Вступ

Легені належать до органів, найбільш чутливих до системного оксидативного стресу [1–7], який розвивається внаслідок крововтрати та ішемічно-реперфузійного ушкодження. Ушкоджувальний механізм останнього насамперед пов'язаний із надмірним утворенням активних форм кисню, що на тлі масивної крововтрати призводить до виснаження системи антиоксидантного захисту [8–12]. Нині загальновізнано, що активація оксидативного стресу ініціюється практично кожним патогенним чинником, зокрема цукровим діабетом, онкологічними захворюваннями та фотостарінням, не кажучи вже про гострі й раптові стани, такі як переломи кісток або крововтрата [13–16]. Водночас найбільш несприятливі наслідки для організму виникають за умов порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, що

супроводжується метаболічними розладами та розвитком запальної відповіді [14, 17-21].

Після значної крововтрати (гострої гіповолемії) зменшується венозне повернення до серця, тобто знижується об'єм крові, що надходить до правого передсердя та надалі – у легеневу артерію. Це, у свою чергу, призводить до зменшення хвилинного об'єму серця та серцевого викиду, а отже – до зниження легеневого кровотоку [22]. Порушення вентиляційно-перфузійних співвідношень додатково сприяє розвитку гіпоксії [23]. З метою підтримання перфузії життєво важливих органів, таких як головний мозок і серце, активується симпатична нервова система, що спричиняє вазоконстрикцію в легенях, шкірі, нирках і шлунково-кишковому тракті з перерозподілом крові в напрямку центрального кровообігу. У результаті легенева перфузія зазнає додаткового вторинного зниження, погіршується тканинна оксигенація та запускається цикл ушкодження, що характеризується прогресуванням гіпоксії й метаболічних порушень.

Вважається, що гіпоперфузія запускає каскад подій, які призводять до гострої травматичної коагулопатії (АТС). Це поєднання ендотеліального ушкодження, спричиненого дефіцитом кисню, та АТС можна розглядати разом як «кров'яну недостатність» – через тісно пов'язані між собою механізми, що лежать в основі цих процесів. [24]. Нині відомо, що порушення згортання крові в умовах травматичного шоку, яке посилює кровотечу, виявляють у 20-30% постраждалих невдовзі після травми. Наявність цього стану підвищує ризик розвитку органної недостатності, збільшує потребу в інтенсивній терапії та навіть може призвести до смерті. [25].

Навіть локальне порушення кровообігу у віддаленій ділянці тіла здатне спричинити каскад метаболічних реакцій, який призводить до ушкодження альвеолярно-капілярного бар'єра. З початком реперфузії ураженого органа (наприклад, кінцівки, на яку накладено гумовий турнікет) з нього в системний кровотік надходять продукти патологічного обміну, що будуть негативно впливати на організм. Якщо мова йде про легені, то цей феномен, відомий як вторинне легеневе ушкодження при ішемії-реперфузії, і його нині розглядають як один із провідних патогенетичних механізмів розвитку поліорганної дисфункції у посттравматичному періоді [26].

Під час реперфузії гіпоксованих тканин відбувається масивне утворення активних форм кисню (АФК), активація нейтрофілів і лейкоцитів-продуцентів АФК, а також вивільнення прозапальних цитокінів. Надлишок вільних радикалів запускає пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) у клітинних мембранах та окисну модифікацію білків (ОМБ) у цитоплазматичних і мембранних структурах [27-29]. У легенях це проявляється порушенням проникності судинної стінки, набряком альвеол, деструкцією сурфактанту та зниженням еластичності легеневої тканини. Зокрема, внаслідок масивної крововтрати на тлі застосування кровоспинного джгута, на 7-му та 14-ту добу після травми спостерігалось значне потовщення міжальвеолярних перетинок за рахунок лімфо-гістіоцитарної інфільтрації, периваскулярно виявлялись дрібні лімфоїдні інфільтрати, збільшувалась макрофагальна інфільтрація стромы [30].

Попри появу нових досліджень ішемічно-реперфузійного синдрому (ІРС), аналіз змін у легеневій тканині і взаємозв'язку між процесами ліпідного окиснення залишається недостатньо вивченим. У попередніх наших дослідженнях ми встановили, що у легенях у відповідь на ІРС, поєднаний з крововтратою чи механічною травмою, рівень ТБК-активних продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) значно підвищувався, досягаючи максимуму на 3-тю добу, а згодом знижувався до 14-ї доби, проте так і не повертався до початкових значень. Рівні ПОЛ на тлі тільки крововтрати чи механічної травми стегна були статистично достовірно нижчими [31].

Однак питання про те, як поєднання ішемічно-реперфузійного фактора з крововтратою або механічною травмою впливає на інші ланки окисдантно-антиоксидантного балансу в легенях і наскільки воно ускладнює перебіг посттравматичного періоду, залишається малодослідженим.

Якщо продукти ПОЛ, зокрема малонового діальдегід (МДА), є маркерами інтенсивності радикального ушкодження мембран, то важливим є вивчення кількісних змін лейкоцитів — продуцентів активних форм кисню (АФК), а також стану окисної модифікації білків у легеневій тканині, що дасть змогу оцінити клітинний внесок у розвиток легеневого ураження.

Метою роботи було дослідити стан окисної модифікації білків легеневої тканини та кількісні зміни лейкоцитів – продуцентів активних форм кисню у сироватці крові експериментальних щурів за умов ішемії-реперфузії кінцівки, поєднаної з крововтратою та механічною травмою.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальна робота була виконана на 260 самцях білих нелінійних щурів 5-місячного віку, що утримувались у віварії із стандартними умовами. Тварин було розподілено на п'ять експериментальних груп, кожна з яких налічувала по 10 особин. Ішемічно-реперфузійний синдром моделювали шляхом накладання гумового джгута шириною 1 см на верхню третину стегна з розрахунком сили тиску під контролем маркування, нанесеного на джгут. Тривалість ішемії становила 2 години, після чого тварин виводили з експерименту через 1 годину реперфузії або в інші передбачені часові точки. Для моделювання крововтрати здійснювали забір 40 % об'єму циркулюючої крові зі стегової вени. Перелом стегової кістки отримували шляхом дозованого удару металевим стрижнем, сила якого була підібрана емпірично, що забезпечувало формування закритого перелому.

Застосовували такі види втручань: накладання гумового джгута на верхню третину стегна тривалістю 2 години з подальшою реперфузією протягом 1 години – моделювання ізолюваного ішемічно-реперфузійного синдрому (експериментальна група ЕГ-1); моделювання крововтрати в об'ємі 40 % від об'єму циркулюючої крові шляхом забору з стегової вени (ЕГ-2); поєднання накладання джгута на стегно з крововтратою в об'ємі 40 % від об'єму циркулюючої крові зі стегової вени протилежної нижньої кінцівки (ЕГ-3); механічна травма, що спричиняла перелом стегової кістки, змодельована за допомогою пристрою «ЩП-1» (ЕГ-4); поєднання накладання джгута на стегно з переломом стегової кістки протилежної нижньої кінцівки (ЕГ-5). Контрольну групу (КГ) становили щурі, яким проводили лише тіопентал-натрієву анестезію в дозі 40 мг/кг маси тіла внутрішньоочеревинно.

Кількість тварин у кожній групі була достатньою та обґрунтованою необхідністю отримання статистично достовірних даних як у межах окремих груп, так і на кожному часовому етапі дослідження з метою оцінки стадій розвитку посттравматичної хвороби, зокрема (як було висвітлено в попередніх публікаціях) активності пероксидного окиснення ліпідів, що і в даному дослідженні було індуковане застосуванням гемостатичного джгута. Окрім цього, найбільш ускладнений перебіг патологічного процесу у тварин груп ЕГ-3 та ЕГ-5 супроводжувався вищою летальністю порівняно з іншими експериментальними групами.

З метою запобігання вираженим проявам больового шоку в день втручання тваринам груп ЕГ-4 та ЕГ-5 протягом 7 діб посттравматичного періоду вводили 2 % розчин лідокаїну. Тваринам інших груп анальгетики вводили двічі – у день втручання та наступного дня.

Виведення тварин з експерименту здійснювали через 1 годину, а також на 1-шу, 3-тю, 7-му та 14-ту добу після травми шляхом тотального кровопускання з серця на тлі тіопентал-натрієвої анестезії.

Оцінку продукції активних форм кисню (АФО) нейтрофільними лейкоцитами крові проводили за допомогою барвника із заблокованою флюоресценцією – дигідродихлорфлюоресцеїну діацетату (ДХФ-ДА) («Sigma Aldrich», USA) методом проточної лазерної цитофлюориметрії на апараті Epics XL («Beckman Coulter», США) за загальноприйнятою методикою [32]. При визначенні окисної модифікації білків у сироватці

крові та 10 % гомогенаті органів базувались на загальновідомій інформації, що в процесі окиснення білків плазми утворюються альдегідні і кетоніві групи, які взаємодіють з 2,4-динітрофенілгідрозимом з формуванням 2,4-динітрофенілгідрозонів, що мають характерний спектр поглинання [33]. Альдегідо- і кетоніпохідні нейтрального характеру рееструються при 370 нм (ОМБ370) та при 430 нм (ОМБ430).

Усі експериментальні етапи роботи виконувались відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), рішення Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001) та наказу Міністерства охорони здоров'я України № 690 від 23 вересня 2009 року.

Статистичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми Excel (Microsoft, США). Статистичну значущість відмінностей між незалежними показниками оцінювали з використанням t-критерію Стьюдента за умови нормального розподілу та непараметричних методів — в інших випадках. Коефіцієнт кореляції вважали статистично значущим при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

У балансі окисного стресу та пов'язаних запальних процесів, ключову роль відіграє

активація NADPH-оксидази в лейкоцитах (зокрема у нейтрофілах). Після ішемії-реперфузії або шоку лейкоцити під стимулом таких медіаторів як амфотерин активує NADPH-оксидазу, що призводить до генерації супероксид-аніону і подальшого утворення інших АФК [34]. Цей процес запускає «респіраторний вибух», посилюючи запальну відповідь, ушкодження судинної стінки й активацію додаткових клітин-ефекторів [35].

Як видно з даних таблиці 1, а також рисунків 1 і 2 при порівнянні змін концентрації АФО з даними КГ, встановлено такі особливості: у ЕГ-1 на тлі ізольованої ішемії-реперфузії кінцівки у ЕГ-1 через 1 год рівень АФО зріс на 40,5 %. На 1-шу, 3-тю і 7-му добу рівень АФО був збільшений суттєво і перевищив дані КГ в 2,2, в 2,9 і в 2 рази відповідно. На 14-ту добу відсоток лейкоцитів, що продукували АФО зменшилася на 11,4 % при $p > 0,05$. На тлі ізольованої крововтрати у ЕГ-2 через 1 год показник АФО перевищив рівень у КГ на 60,5 %.

Дослідна група	Термін реперфузійного періоду				
	1 год	1 доба	3 доба	7 доба	14 доба
Контроль = 0,114 (0,105; 0,120) (n=10)					
Група 1 Ішемія-реперфузія	16,02* (15,34; 17,03) (n=10)	25,30* (25,20; 27,79) (n=10)	20,85* (19,49; 22,20) (n=10)	22,88* (21,24; 24,24) (n=10)	12,70 (12,10; 13,89) (n=10)
Група 2 Крововтрата	18,30* (17,08; 19,49) (n=7)	27,58* (25,87; 29,35) (n=7)	27,21*(25,86;28,28) (n=6)	27,30* (26,34; 28,51) (n=7)	23,24* (21,19; 23,82) (n=7)
Група 3 Ішемія-реперфузія+крововтрата	18,36* (16,62; 19,15) (n=6)	28,08* (27,37; 29,29) (n=6)	26,35* (25,66; 26,43) (n=6)	29,62* (27,30;31,53) (n=6)	38,05* (35,70;39,40) (n=5)
p1-3	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05
p2-3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
Група 4 Травма	13,31* (12,67;14,19) (n=10)	17,67* (17,00;19,99) (n=10)	22,65* (21,08;23,48) (n=10)	23,60*(22,80;24,89) (n=10)	19,11* (17,51; 20,91) (n=10)
Група 5 Ішемія-реперфузія+травма	17,00* (16,04; 18,90) (n=9)	29,15* (27,50; 31,16) (n=9)	19,08* (17,45;20,50) (n=8)	26,32* (25,18;28,75) (n=9)	30,26* (29,32;34,24) (n=9)
p1-5	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05
p4-5	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Table 1. Вміст лейкоцитів, що генерують АФО, у крові (%), після ішемії-реперфузії кінцівки, крововтрати та механічної травми (Me (LQ; UQ) - медіана (нижній і верхній квартилі))

Також на 1-шу, 3-тю, 7-му добу він був вищим від КГ в 2,41 і в 2,39 рази відповідно. Також залишалася підвищеною в 2 рази і на 14-ту добу. Що стосується рівня АФО на тлі ІРК, поєднаної з масивною крововтратою, то в ЕГ-3 встановлено, що через 1 год після втручання рівень перевищив дані КГ на 61,1 %. На 1-шу добу після травми перевищував вже у 2,5 рази, після чого незначно знизився і перевищував рівень КГ в 2,3 рази на 3-тю добу. Проте на 7-му і 14-ту добу показник зростав, перевищуючи рівень КГ в 2,6 і в 3,3 рази відповідно.

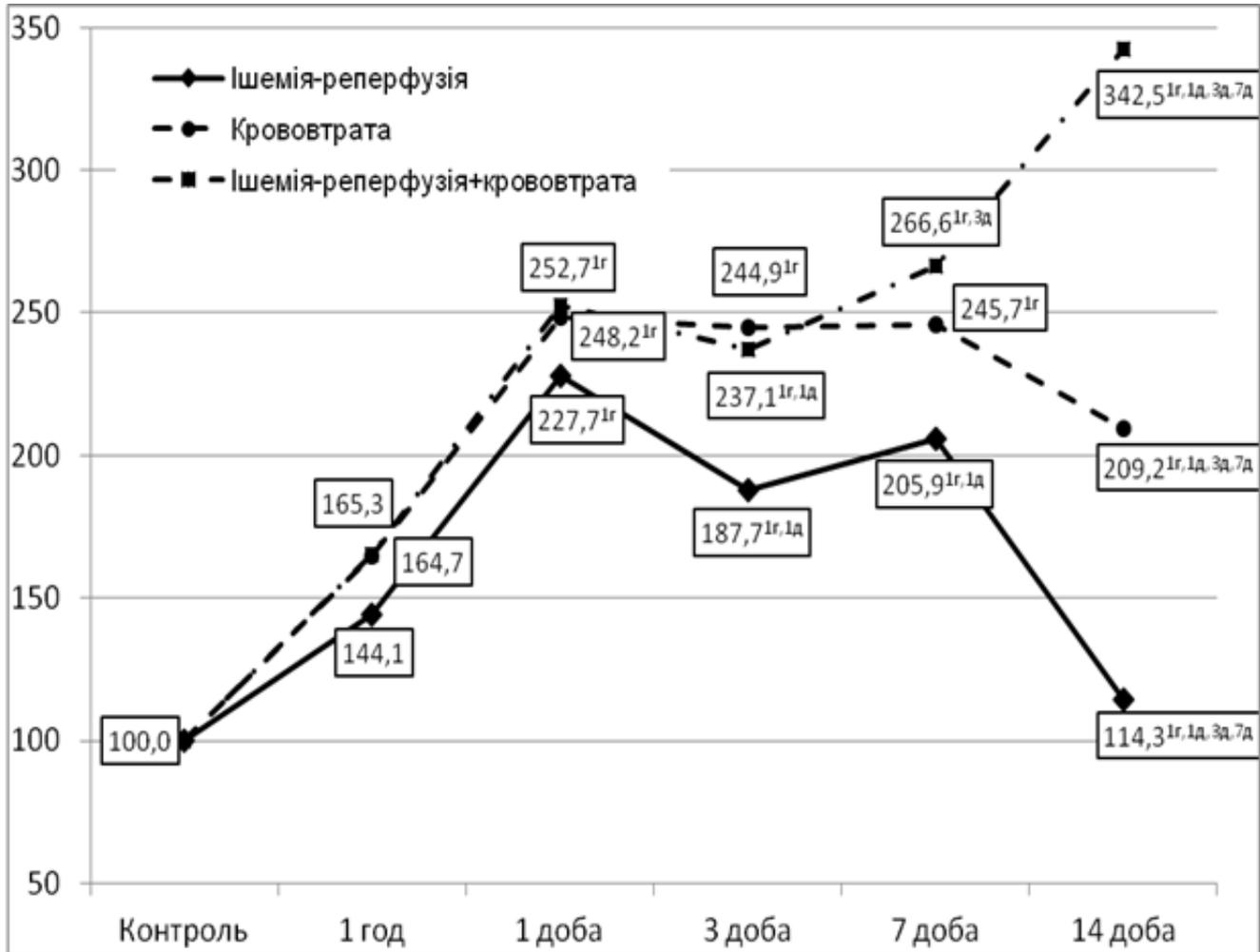


Figure 1. Динаміка вмісту лейкоцитів-продуцентів АФО крові (у відсотках до рівня контролю) після ішемії-реперфузії кінцівки та крововтрати.

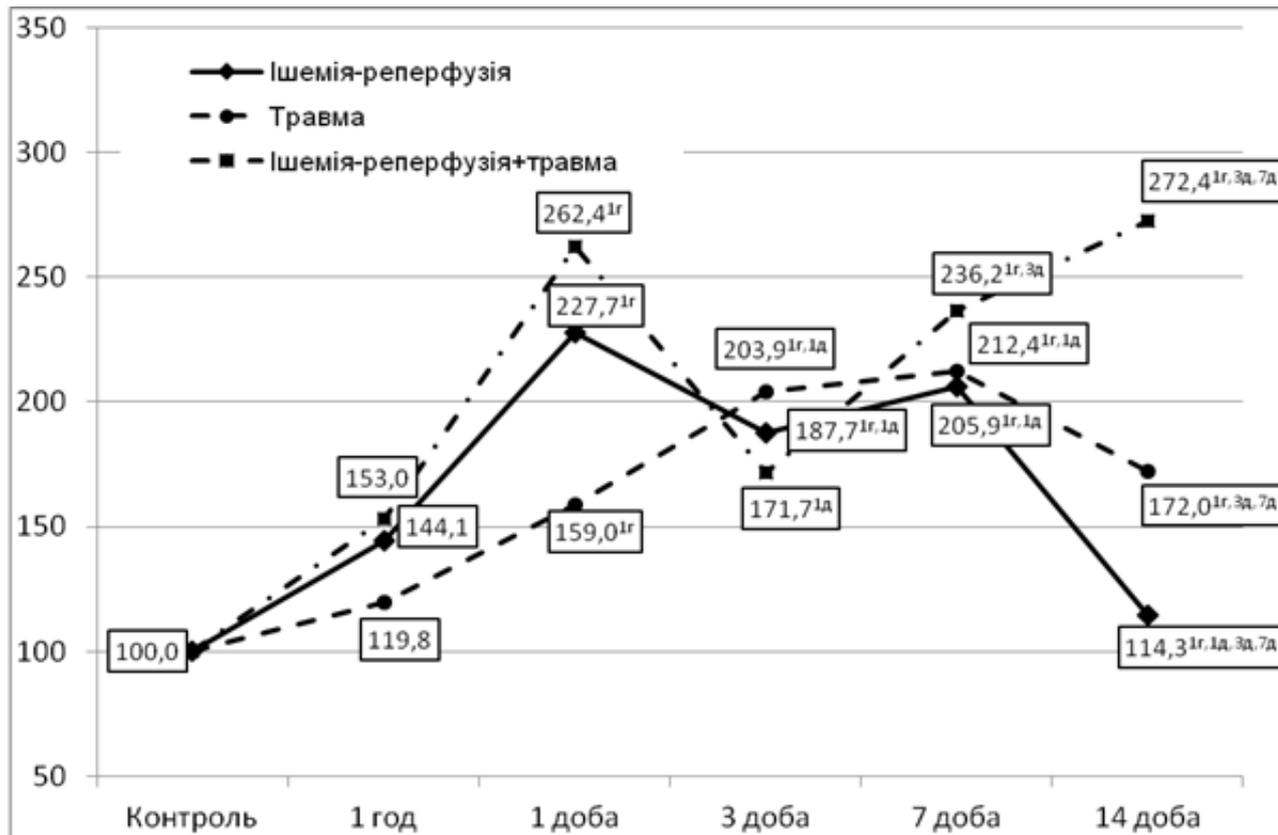


Figure 2. Динаміка вмісту лейкоцитів-продуцентів АФО у крові (у відсотках до рівня контролю) після ішемії-реперфузії кінцівки та механічної травми

На тлі ізолюваної травми у ЕГ-4 через 1 год після моделювання показник АФО перевищив дані КГ на 16,75 %. На 1-шу і на 3-тю добу – він зростає, перевищуючи дані КГ на 55 і на 98,7 % відповідно. Найвище зростання, порівняно з КГ, встановлено на 7-му добу, коли показник перевищив дані в 2,1 раз.

На 14-ту добу він і далі задишався підвищеним – на 67,6 %. Що стосується механічної травми, поєднаної з ІРК, то якщо через 1 год показник був вищим від даних КГ на 49,1 %, то вже на 1-шу добу він перевищив рівень КГ в 2,6 раз. На 3-тю добу зафіксовано зниження концентрації продуцентів АФО, хоча рівень і був вищим за КГ на 67,4 %. Проте вже на 7-му і 14-ту добу рівень перевищив КГ в 2,3 і в 2,7 раз відповідно.

Залежно від ступеня ушкодження організму внаслідок експериментальних втручань, генерація АФО мала свої особливості. Як видно з таблиці 1 та рисунків 1 s 2 у ЕГ-1, як і у решти, був доволі високий ступінь продукції АФО із піком, що припав на 1-шу добу. У ЕГ-2 змішана гіпоксія на тлі ізолюваної масивної крововтрати призвела до ще більш виражених змін вже в перші години після втручання. Так, на 1-шу добу показник перевищував рівень, зафіксований через 1 год на 50,7 %, а на 3-тю добу – перевищував рівень 1 год на 48,7 %. На 7-му добу концентрація нейтрофілів-продуцентів АФО зростає, порівняно з 1 год, на 49,2 %. При цьому, на 14-ту добу, будучи вищим від даних 1 год на 27 %, показник все ж був нижчим від даних 1-ої, 3-ої і 7-ої діб на 15,7, на 14,6 і на 14,8 % відповідно. У ЕГ-3 динаміка патогенезу була схожою до ЕГ-2, але ще більш вираженою. У ЕГ-4 на 3 добу рівень перевищив дані 1 год на 70,2 %, також рівень 1 доби – на 28,2 %. На 14-ту добу, незважаючи на зниження патогенетичної активності порівняно з 7 добою – на 81 %, порівняно з 3 добою – на 15,6 %, все ж залишалась вищим від рівня 1 год на 43,6 %. На тлі ІРК, поєднаної з механічною травмою у ЕГ-5 динаміка була дещо більш вираженою, порівняно з ЕГ-4.

Також, при порівнянні ступеня зростання АФО між групами з модифікаціями експериментального втручання виявлено, що присутність ІРК погіршувала перебіг як ізольованої крововтрати, так і ізольованої механічної травми. Так, через 1 год після втручання і на 1-шу добу статистичної достовірної різниці між рівнем АФО у ЕГ-1 і ЕГ-3, а також між ЕГ-2 і ЕГ-3 не було встановлено, хоча рівень продуцентів АФО зріс у всіх групах. При цьому на 3-тю добу рівень АФО у ЕГ-3 був вищим за рівень АФО у ЕГ- 1 на 26,4 % ($p < 0,05$), а щодо рівня АФО у ЕГ-2 -був вищим на 3,2 % ($p > 0,05$). На 7-му добу особливості відмінностей були аналогічні, коли рівень АФО у ЕГ-3 перевищив дані ЕГ-1 і ЕГ-2 на 29,5 % ($p < 0,05$) і на 8,5 % ($p > 0,05$) відповідно. І тільки на 14-ту добу рівень продуцентів АФО у ЕГ-3 був статистично достовірно вищим порівняно з обома групами: щодо ЕГ-1 в 3 рази, щодо ЕГ-2 - на 63,7 %.

Що стосується впливу ІРК на наслідки механічної травми, яка сама по собі супроводжувалась помірним зростанням концентрації АФО, то виявлено такі особливості: через 1 год після втручання встановлено, що у ЕГ-5 рівень АФО був статистично достовірно вищим порівняно з рівнем у ЕГ-4 - на 27,4 %.

Через 1 добу рівень АФО у ЕГ-5 перевищував рівень АФО у ЕГ-1 на 15,2 % ($p > 0,05$) і у ЕГ-4 на 65, % ($p < 0,05$). На 3-тю добу після втручання рівень АФО у ЕГ-5 був вищим за дані ЕГ-1 на 8,5 % ($p > 0,05$) і на 15,8 % у ЕГ-4 ($p < 0,05$). Проте, вже на 7-му добу статистично достовірна різниця встановлена при порівнянні з обома групами. Так, у ЕГ-5, порівняно з ЕГ-1, був вищий рівень АФО на на 16,3 %, а порівняно з ЕГ-4 - на 12,8 %. Також, на 14-ту добу, рівень АФО у ЕГ-5 був вищим за дані ЕГ-1 в 2,4 рази, а за дані ЕГ-4 - на 58,3 %.

Як видно з даних таблиці 2 та рисунків 3, 4 стан ОМБ370 у легенях суттєво змінювався на тлі кожної з експериментальних модифікацій.

Дослідна група	Термін реперфузійного періоду				
	1 год	1 доба	3 доба	7 доба	14 доба
Контроль = 0,730 (0,702; 0,756) (n=10)					
Група 1 Ішемія-реперфузія	1,030 (0,880;1,122)* (n=10)	1,132 (1,124;1,202)* (n=10)	1,692 (1,622;1,722)* (n=10)	1,311 (1,300;1,378)* (n=10)	0,885 (0,822;0,944)* (n=10)
Група 2 Крововтрата	1,940 (1,882;1,946)*(n=7)	2,642 (2,512;2,644)* (n=7)	3,284 (3,112;3,342)* (n=6)	1,962 (1,922;2,022)* (n=7)	1,808 (1,760;1,888)* (n=7)
Група 3 Ішемія-реперфузія крововтрати	2,254 (2,198;2,266)* (n=6)	2,920 (2,922;3,066)* (n=6)	3,581 (3,488;3,608)* (n=6)	2,221 (2,122;2,288) * (n=6)	1,947 (1,912;2,011)* (n=5)
p1-3	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
p2-3	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05
Група 4 Травма	0,988 (0,944;1,072) (n=10)	1,294 (1,200;1,346)* (n=10)	1,615 (1,546;1,688)* (n=10)	1,532 (1,498;1,592)* (n=10)	1,415 (1,410;1,502) (n=10)
Група 5 Ішемія-реперфузія+травма	1,670 (1,625;1,712)* (n=9)	1,970 (1,922;2,264)* (n=9)	2,442 (2,398;2,486)* (n=8)	2,133 (2,098;2,198)*(n=9)	1,850 (1,788;1,856)* (n=9)
p1-5	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
p4-5	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Table 2. Стан ОМБ 370 (ммоль/г) в 10 % гомогенаті легень при 370 нм після ішемії-реперфузії кінцівки, крововтрати та механічної травми (Me (LQ ; UQ) - медіана (нижній і верхній квартилі)

Так, порівняно з даними КГ, у ЕГ-1 показник вже через 1 год зріс на 41,1 і був більшим від КГ на 55,1 % на 1-шу добу. Пік зростання припав на 3-тю добу, коли показник був вищим в 2,32 рази, а на 7-му і 14-ту добу він, хоч і знизився, але до норми не повернувся - був більшим на 79,6 і на 21,2 % відповідно. У ЕГ-2 масивна крововтрата призвела до суттєвого зростання ОМБ в тканині легені, яка вже через 1 год реінфузії перевищила дані КГ у 2,66 рази, а на 1-шу добу

після втручання була більшою у 3,62 раза. Пік концентрації припав на 3-тю добу, коли показник був вищим у 4,93 раза. Також хоч активність окиснення білків і зростала в наступні дослідні періоди, але і на 7-му, і на 14-ту добу суттєво перевищувала дані КГ – у 2,68 і у 2,48 раза відповідно. Що стосується показника у ЕГ-3, то він зростав особливо сильно – через 1 год після реінфузії перевищила дані КГ в 3,08 раза, а на 1-шу добу був більшим у 4 раза. Пік зростання теж припав на 3-тю добу, коли показник був більшим у 4,9 раза. Незважаючи на те, що ОМБ знижувалась до кінця дослідного періоду. Все рівно перевищувала КГ на 7-му і 14-ту добу у 3,04 і у 2,67 раза відповідно. Що стосується ЕГ-4 і ЕГ-5, то показник через 1 год перевищив дані КГ на 35,3 % і у 2,29 раза відповідно. Далі, у ЕГ-1 на 1-шу, 3-тю, 7-му і 14-ту добу показник був вищим у 77,3, у 2,21, у 2,1 раза і на 93,8 % відповідно. Також показник у ЕГ-5 був ще вищим від даних КГ у всьому дослідному періоді – на 1-шу і 3-тю доби перевищив у 2,29 і у 2,7 раза, досяг піку зростання на 3-тю добу, будучи вищим від даних КГ у 3,35 раза і залишався суттєво підвищеним на 7-му і 14-ту добу – у 2,92 і у 2,53 раза.

Схожа динаміка виявлена і при оцінюванні активності ОМБ при 430 нм в легенях після експериментальних втручань. Як видно з таблиці 2, у ЕГ-1 показник перевищував дані КГ на 96,6 % через 1 год, а вже на 1-шу, 3-тю і 7-му добу був вищим у 2,41, у 3,01 і у 2,9 раза відповідно. Незважаючи на те, що показник на 14-ту добу знизився, все ж залишався вищим щодо даних КГ на 92,1 %. У ЕГ-2 та ЕГ-3 показник був вищим від даних КГ у 3,29 і у 4,8 раза відповідно. Далі, у ЕГ-2 на 1-шу, 3-тю, 7-му і 14-ту добу показник був вищим, порівняно з даними КГ, у 5,7, у 7,21, у 3,98 і у 3,59 раза відповідно. Показник у ЕГ-3 був ще більшим, переважаючи дані КГ на 1-шу, 3-тю, 7-му і 14-ту добу у 6,46, у 7,78, у 6,25 і у 5,81 раза відповідно. Також, показники у ЕГ-4 і ЕГ-5 були вищі за дані КГ у всіх досліджуваних часових періодах. Так, через 1 год показник у ЕГ-4 і ЕГ-5 перевищив дані КГ на 39,1 % і у 3,76 раза відповідно. Далі, у ЕГ-4, показник був вищим за дані КГ на 1-шу, 3-тю, 7-му і 14-ту добу після травми – у 2,32, у 3,2, у 2,29 і у 2,1 раза відповідно. Показник у ЕГ-5 зростав ще більше і на 1-шу, 3-тю, 7-му і 14-ту доби переважав дані КГ у 4,28, у 5,21, у 4,51 і у 3,97 раза відповідно.

Дослідна група	Термін реперфузійного періоду				
	1 год	1 доба	3 доба	7 доба	14 доба
Контроль = 0,407 (0,374; 0,422) (n=10)					
Група 1 Ішемія-реперфузія	0,802 (0,688;0,844)* (n=10)	0,981 (0,925;1,022)* (n=10)	1,227 (1,188;1,286)* (n=10)	1,179 (1,066;1,226)* (n=10)	0,782 (0,746;0,842) (n=10)
Група 2 Крововтрата	1,344 (1,298;1,366)* (n=7)	2,321 (2,302;2,388)* (n=7)	2,934 (2,932;3,126)* (n=6)	1,622 (1,546;1,862)* (n=7)	1,460 (1,432;1,512)* (n=7)
Група 3 Ішемія-реперфузія крововтрата	1,954 (1,922;2,012)* (n=6)	2,630 (2,566;2,724)* (n=6)	3,165 (3,064;3,224) * (n=6)	2,544(2,448;2,612) * (n=6)	2,363 (2,322;2,415)* (n=5)
p1-3	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
p2-3	0,05	<0,05	0,05	0,05	0,05
Група 4 Травма	0,566 (0,532;0,588) (n=10)	0,946 (0,862;1,014) * (n=10)	1,304 (1,264;1,346)* (n=10)	0,932 (0,928;0,998)* (n=10)	0,856 (0,812;0,922) (n=10)
Група 5 Ішемія-реперфузія+травма	1,530 (1,468;1,536)* (n=9)	1,740 (1,724;1,988)* (n=9)	2,120 (2,108;2,188)* (n=8)	1,837 (1,788;1,842)* (n=9)	1,615 (1,588;1,695)* (n=9)
p1-5	0,05	<0,05	0,05	0,05	<0,05
p4-5	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

Table 3. Стан ОМБ в 10 % гомогенаті легень при 430 нм після ішемії-реперфузії кінцівки, крововтрати та механічної травми (Me (LQ ; UQ) - медіана (нижній і верхній квартилі))

При порівнянні вираженості показника між групами з різним ступенем тяжкості втручання виявлено ускладнювальний вплив ІРК на прояви масивної крововтрати та механічної травми. Так, показник у ЕГ-3 через 1 год після реінфузії був вищим за дані ЕГ-1 і ЕГ-2 в 2,44 раза і на

45,8 % відповідно. Далі, показник у ЕГ-3 був вищим за дані ЕГ-1 на 1-шу, 3-тю, 7-му і 14-ту добу у 2,68, у 2,58, у 2,16 і у 3,02 раза відповідно. Залишався він підвищеним і при порівнянні з даними ЕГ-2 – на 1-шу, 3-тю, 7-му і 14-ту добу був вищим на 13,4, на 7,9, на 57 і на 61,8 % відповідно. Порівняння показників ЕГ-1 і ЕГ-4 виявило певні особливості, які показали, що на тлі ІРК та ізолюваної механічної травми рівень ОМБ в легенях відбувається досить активно, але спричиняє компенсовану відповідь з боку АОС, оскільки до кінця дослідного періоду суттєво знижується, хоч і не досягає вихідного рівня. Так, показник у ЕГ-4 був навіть дещо нижчим від даних ЕГ-1 через 1 год після втручання – на 41,3 %. На 1-шу і 7-му доби така пропорція утримувалась, показник у ЕГ-4 був нижчим від даних ЕГ-1 на 3,6 % ($p > 0,05$) і на 26,5 % відповідно, і лише на 14-ту добу показник у ЕГ-4 перевищив дані ЕГ-1 на 9,5 %. Проте, показник у ЕГ-5 був вищим за дані ЕГ-1 у всьому післятравматичному періоді, будучи вищим через 1 год реінфузії, на 1-шу, 3-тю, 7-му і 14-ту добу на 91,3, на 77,6, на 72,8 і на 55,8 % і у 2,07 раза відповідно.

Зростання рівня ОМБ в сироватці, хоч і не було настільки інтенсивним, як у внутрішніх органах, проте відбувалося і за рівнями, які перевищували дані КГ. Отже, зрозуміло, що ІРК має ускладнювальний вплив на прояви масивної крововтрати та механічної травми.

Висновки та обговорення

При дослідженні кількості лейкоцитів-продуцентів АФО встановлено, що навіть 2-годинне ізолюване застосування кровоспинного турнікета в здоровому організмі тварини викликало зростання даного показника вже через 1 год після реперфузії. Отримана нами динаміка генерації АФО лейкоцитами та збільшення окисної модифікації білків у легенях (піки на 1–3 добу з частковим зниженням до 14-ї доби, але без повернення до базового рівня) узгоджується з даними, опублікованими в сучасній літературі. Однак, у матеріалах дослідження саме моделюваннях ішемії-реперфузії легень призводило до їх ушкодження [2], в той час, як ІР віддаленого органа мала схожий ефект. У доступній літературі описується рання «фаза респіраторного вибуху», коли нейтрофіли через активацію NADPH-оксидази масово продукують супероксид і інші АФО, що спричинює ендотеліальне ушкодження і підвищення судинної проникності – механізми, які пояснюють швидке зростання маркерів на першій добі.

Дослідження показника окисної модифікації білків встановило, що цей процес зростав у кожному досліджуваному органі (печінці, нирках, серці), зокрема, й у легенях і в жодній з експериментальних модифікацій до норми не повертався до кінця експериментального періоду спостереження. При порівнянні вираженості ОМБ між групами з різним ступенем тяжкості встановило, що додаткове моделювання ІРК, поєднане з крововтратою чи травмою призводило до зростання окисної модифікації білків. Наші дані про те, що кінцівкова ішемія-реперфузія є небезпечною, узгоджуються із наступними: кілька експериментальних робіт із моделюванням турнікета та інфраренальної або кінцівкової ішемії-реперфузії продемонстрували значну системну реакцію з ураженням віддалених органів (зокрема, легень) [35]: підвищення рівнів TBARS/MDA та білкових карбонілів у легеневій тканині, зниження функції мітохондрій і тривалу посилену продукцію прозапальних цитокінів, що відповідає нашому спостереженню про більш виражені зміни при поєднанні ІРС з крововтратою чи травмою. Також у недавніх оглядах підкреслюють роль порушення мікроциркуляції та ендотеліальної деградації (глікокаліксу) як критичного фактору, що робить легені особливо чутливими до геморагічного шоку і реперфузійного стресу; це пояснює, чому в групах із комбінованими ушкодженнями (ЕГ-3, ЕГ-5) спостерігались найвищі та найбільш тривалі рівні ОМБ і АФО [36]. Отже, наші результати узгоджуються з концепцією ранньої активації клітинного джерела ROS (лейкоцитів, нейтрофілів), що неминуче пов'язано з посиленням ліпідною пероксидацією та подальшим стійким порушенням антиоксидантних механізмів у легенях після ІРС та супутніх травм/крововтрати, і підтверджується як експериментальними, так і оглядовими публікаціями [37–39]. Таким чином, поєднані ушкодження, пов'язані з ішемічно-реперфузійним синдромом та крововтратою або травмою, суттєво посилюють оксидативне ушкодження легень, що підкреслює доцільність спрямованої

корекції оксидативного стресу у системі захисту органів у ранньому посттравматичному періоді.

References

1. Liu S, Liu J, Wang Y, Deng F, Deng Z. Oxidative Stress: Signaling Pathways, Biological Functions, and Disease. *MedComm* (2020). 2025 Jul 1;6(7):e70268. doi: 10.1002/mco2.70268. PMID: 40599237; PMCID: PMC12209598.
2. Ferrari RS, Andrade CF. Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:590987. doi: 10.1155/2015/590987. Epub 2015 Jun 16. PMID: 26161240; PMCID: PMC4487720
3. Ayala, A., Chung, C. S., Lomas, J. L., Song, G. Y., Doughty, L. A., Gregory, S. H., & Cioffi, W. G. (2002). Shock-induced neutrophil mediated priming for acute lung injury in mice. *The American Journal of Pathology*, 161 (6), 2283 – 2294
4. Bakowitz, M., Bruns, B., & McCunn, M. (2012). Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in trauma patients. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, 20, 54. <https://doi.org/10.1186/1757-7241-20-54>
5. Shoemaker WC, Appel P, Czer LS, Bland R, Schwartz S, Hopkins JA. Pathogenesis of respiratory failure (ARDS) after hemorrhage and trauma: I. Cardiorespiratory patterns preceding the development of ARDS. *Crit Care Med*. 1980 Sep;8(9):504-12. doi: 10.1097/00003246-198009000-00006.
6. Amman, A. M., Wolfe, V., Piraino, G., Ziady, A., & Zingarelli, B. (2024). Humanin-G Ameliorates Hemorrhage-Induced Acute Lung Injury in Mice Through AMPK α 1-Dependent and -Independent Mechanisms. *Biomedicines*, 12(11), 2615. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12112615>
7. van Leeuwen, A. L. I., Borgdorff, M. P., et al. (2021). Therapeutically targeting microvascular leakage in experimental hemorrhagic shock: A systematic review and meta-analysis. *Shock*, 56(5), 890-900. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001796
8. Vazhnichaya E M, Baliuk O Ye, Bobrova N O. Oxidative stress: classic doctrine and its update. *Bulletin of problems in biology and medicine*. 2023 – Issue 2 (169);
9. Han, S.-J., Zhou, Z.-W., Yang, C., & Peng, G. (2022). Hemorrhagic, hypovolemic shock resuscitated with Ringer's solution using bicarbonate versus lactate: A CONSORT-randomized controlled study comparing patient outcomes and blood inflammatory factors. *Medicine*, 101(46), e31671. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000031671>
10. Huang Q, Wang Y, Zhang Z, Wu M, Liu J, Chen J, Li J, Yao Y, Guo C, Zhao D, Qi W, Li X. Organ dysfunction induced by hemorrhagic shock: From mechanisms to therapeutic medicines. *Pharmacol Res*. 2025 Jun;216:107755. doi: 10.1016/j.phrs.2025.107755. Epub 2025 May 1. PMID: 40315969.
11. Meza Monge K, Ardon-Lopez A, Pratap A, Idrovo JP. Targeting Inflammation After Hemorrhagic Shock as a Molecular and Experimental Journey to Improve Outcomes: A Review. *Cureus*. 2025 Jan 21;17(1):e77776. doi: 10.7759/cureus.777
12. Yao Z, Chen Y, Li D, Li Y, Liu Y, Fan H. HEMORRHAGIC SHOCK ASSESSED BY TISSUE MICROCIRCULATORY MONITORING: A NARRATIVE REVIEW. *Shock*. 2024 Apr 1;61(4):509-519. doi: 10.1097/SHK.0000000000002242. Epub 2023 Sep 29. PMID: 37878487.
13. Sena CM, Leandro A, Azul L, Seica R, Perry G. Vascular oxidative stress: impact and therapeutic approaches. *Front Physiol*. 2018Dec;9:1668. DOI: 10.3389/fphys.2018.01668.
14. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*. 2007Jun;2(2):219-36. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2684512/#_ffn_sectitle.
15. Klaunig JE. Oxidative stress and cancer. *Curr Pharm Des*. 2018;24(40):4771-8. DOI: 10.2174/1381612825666190215121712.
16. Nakai K, Tsuruta D. What are reactive oxygen species, free radicals, and oxidative stress in skin diseases? *Int J Mol Sci*. 2021 Oct;22(19):10799. DOI: 10.3390/ijms221910799
17. Ji LL, Yeo D. Oxidative stress: an evolving definition. *Fac Rev*. 2021 Feb;10:13. DOI:

10.12703/r/10-13

18. Trembl B, Kleinsasser A, Knotzer J, Breitkopf R, Velik-Salchner C, Rajsic S. Hemorrhagic Shock: Blood Marker Sequencing and Pulmonary Gas Exchange. *Diagnostics* (Basel). 2023 Feb 9;13(4):639. doi: 10.3390/diagnostics13040639. PMID: 36832127; PMCID: PMC9955920.
19. Meza Monge, K., Rosa, C., Sublette, C., Pratap, A., Kovacs, E. J., & Idrovo, J.-P. (2024). Navigating hemorrhagic shock: Biomarkers, therapies, and challenges in clinical care. *Biomedicines*, 12(12), 2864. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12122864>
20. Jia, B., Ye, J., Gan, L., Li, R., Zhang, M., Sun, D., Weng, L., Xiong, Y., Xu, J., Zhang, P., Huang, W., Zheng, M., & Wang, T. (2022). Mitochondrial antioxidant SkQ1 decreases inflammation following hemorrhagic shock by protecting myocardial mitochondria. *Frontiers in Physiology*, 13, Article 1047909. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1047909>
21. Li, Y., Dubick, M. A., Yang, Z., Barr, J. L., Gremmer, B. J., Lucas, M. L., et al. (2020). Distal organ inflammation and injury after resuscitative endovascular balloon occlusion of the aorta in a porcine model of severe hemorrhagic shock. *PLOS ONE*, 15(11), e0242450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242450>
22. Lira A., Pinsky M. Choices in fluid type and volume during resuscitation: impact on patient outcomes // *Annals of Intensive Care* — 2014. — 4. — 38.
23. Slobod D, Damia A, Leali M, Spinelli E, Mauri T. Pathophysiology and Clinical Meaning of Ventilation-Perfusion Mismatch in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Biology* (Basel). 2022 Dec 30;12(1):67. doi: 10.3390/biology12010067. PMID: 36671759; PMCID: PMC9855693. (скаай)
24. Bjerkgvig, C. K., Strandenes, G., Eliassen, H. S., Spinella, P. C., Fosse, T. K., Cap, A. P., & Ward, K. R. (2016). "Blood failure" time to view blood as an organ: How oxygen debt contributes to blood failure and its implications for remote damage control resuscitation. *Transfusion*, 56(S2), S182–S189. <https://doi.org/10.1111/trf.13500>
25. White, N.J., Ward, K.R. (2020). Blood Failure: Pathophysiology and Diagnosis. In: Spinella, P. (eds) *Damage Control Resuscitation*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20820-2_3
26. Lee, J. H., & Ward, K. R. (2024). Blood failure: Traumatic hemorrhage and the interconnections between oxygen debt, endotheliopathy, and coagulopathy. *Clinical and Experimental Emergency Medicine*, 11(1), 9–21. <https://doi.org/10.15441/ceem.23.127>
27. Ferrari, R. S., & Andrade, C. F. (2015). Oxidative stress and lung ischemia-reperfusion injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 590987. <https://doi.org/10.1155/2015/590987>
28. Gielis, J. F., Beckers, P. A. J., Briedé, J. J., Cos, P., & Van Schil, P. E. (2017). Oxidative and nitrosative stress during pulmonary ischemia-reperfusion injury: From the lab to the OR. *Annals of Translational Medicine*, 5(6). <https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.32>
29. Granger, D. N., & Kvietys, P. R. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biology*, 6, 524–551. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.020>
30. Максимів Р.В., Горбань І.І., Стахів О.В., Шацький В.В., Стрельбицька І.В. Порівняльний вплив ішемії-реперфузії кінцівки на стан внутрішніх органів в експерименті. *Екстрена медична допомога в надзвичайних умовах : матеріали всеукр. наук.-практ. Конф., 20-24.02 2019 р. Тернопіль : укрмедкнига, 2019. С. 49-50.*
31. Волотовська Н. В., Гудима А. А., Вадзюк Н. С. Прогностичне значення динаміки вмісту малонового діальдегіду в нирці щурів на тлі ішемічно-реперфузійного ушкодження кінцівки. *Вісник медичних і біологічних досліджень*. 2019. № 2. С. 4-10.
32. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *Journal of Immunology*. 1983;130(4):1910-1917.
33. Мецишен ІФ. Метод визначення оксинювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові. *Буковинський медичний вісник*. 1998;2(1):156-158.
34. Fan J, Li Y, Levy RM, Fan JJ, Hackam DJ, Vodovotz Y, Yang H, Tracey KJ, Billiar TR, Wilson MA. Hemorrhagic shock induces NAD(P)H oxidase activation in neutrophils: role of

- HMGB1-TLR4 signaling. *J Immunol.* 2007 May 15;178(10):6573-80. doi: 10.4049/jimmunol.178.10.6573. PMID: 17475888.
35. Révész C, Kaucsár T, Godó M, Bocskai K, Krenács T, Mócsai A, Szénási G, Hamar P. Neutrophils and NADPH Oxidases Are Major Contributors to Mild but Not Severe Ischemic Acute Kidney Injury in Mice. *Int J Mol Sci.* 2024 Mar 3;25(5):2948. doi: 10.3390/ijms25052948. PMID: 38474193; PMCID: PMC10932292.
36. Han, Y. K., Kim, J. S., Lee, G. B., Lim, J. H., & Park, K. M. (2021). Oxidative stress following acute kidney injury causes disruption of lung cell cilia and their release into the bronchoalveolar lavage fluid and lung injury, which are exacerbated by *Idh2* deletion. *Redox Biology*, 46, 102077. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102077>
37. Packialakshmi B, Stewart IJ, Burmeister DM, Feng Y, McDaniel DP, Chung KK, Zhou X. Tourniquet-induced lower limb ischemia/reperfusion reduces mitochondrial function by decreasing mitochondrial biogenesis in acute kidney injury in mice. *Physiol Rep.* 2022 Feb;10(3):e15181. doi: 10.14814/phy2.15181
38. Esme H, Fidan H, Koken T, Solak O. Effect of lung ischemia--reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006 Mar;29(3):294-8. doi: 10.1016/j.ejcts.2005.12.008. Epub 2006 Jan 24. PMID: 16439150.
39. Volotovska, N. (2020). Why the lungs became a target organ due to ischemic-reperfusion syndrome of the limb, caused by the use of haemostatic tourniquet. *Journal of Education, Health and Sport*, 10(6), 186–198. <https://doi.org/10.12775/JEHS.2020.10.06.021>