

ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК И ПРОЦЕССЫ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ЛЕЙКОЦИТОВ У ПОСТРАДАВШИХ С ТЯЖЕЛОЙ ТРАВМОЙ

В. В. Мороз¹, Е. А. Мягкова¹, А. К. Жанатаев², Г. А. Рябов¹
Д. А. Остапченко¹, А. Д. Дурнев², В. И. Решетняк¹

¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, Москва, Россия
107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

² Научно-исследовательский институт фармакологии им. В. В. Закусова, Москва, Россия
125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8

DNA Damages and White Blood Cell Death Processes in Victims with Severe Injury

V. V. Moroz¹, E. A. Myagkova¹, A. K. Zhanataev², G. A. Ryabov¹,
D. A. Ostapchenko¹, A. D. Durnev², V. I. Reshetnyak¹

¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Moscow, Russia;
25, Petrovka St., Build. 2, Moscow 107031

² V. V. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russia;
8, Baltiyskaya St., Moscow 125315

Цель исследования. Изучить механизмы развития посттравматических изменений в клетках крови путем исследования ДНК-повреждений, связанных с гипоксией, вызванной массивной кровопотерей при тяжелой травме. **Материалы и методы.** Для исследования ДНК-повреждений, процессов некроза и апоптоза белых клеток крови было обследовано 95 больных в возрасте $40,6 \pm 16,5$ лет (от 20 до 79 лет), перенесших тяжелую механическую травму с различными объемами потери крови (от 100 до 4000 мл) и нарушениями гемодинамики. Среднее значение потери крови (ПК) с учетом веса пострадавших составило $21,5 \pm 16,5$ мл/кг (от 1,4 до 61,5 мл/кг). Пострадавшие были разделены в зависимости от объема потери крови на четыре группы: КР I СТ (кровопотеря I степени тяжести) – 26 пострадавших, объем потери крови (ОПК) составил меньше 750 мл ($5,93 \pm 2,41$ мл/кг); КР II СТ – 23 пострадавших, ОПК составил 750–1500 мл ($11,5 \pm 1,5$ мл/кг); КР III СТ – 23 пострадавших, ОПК составил 1500–2000 мл ($23,8 \pm 4,0$ мл/кг); КР IV СТ (кровопотеря IV степени тяжести) – 23 пострадавших, ОПК составил более 2000 мл ($45,6 \pm 10,1$ мл/кг); в зависимости от вида травмы: ТСТ (тяжелая скелетная травма) – 17 пострадавших, ЧМТ (черепно-мозговая травма) – 43 пострадавших, ТСТ+ЧМТ (сочетание тяжелой скелетной и черепно-мозговой травм) – 35 пострадавших. В зависимости от развития инфекционных осложнений: инфекция «+» – 69 пострадавших у которых на 5–7-е сутки после травмы развились инфекционные осложнения; инфекции «-» – 26 пострадавших. Для оценки влияния гипоксии на ДНК-повреждения, процессы апоптоза и некроза белых клеток крови общая группа пострадавших с травмой была разделена на 2 группы: гипоксия «+» – 18 пострадавших; гипоксии «-» – 10 пострадавших, у которых при поступлении в реаниматологическое отделение все 4 показателя (pO_2 в капиллярной крови, уровень лактата, pH и BE плазмы крови) были в пределах нормы. ДНК-повреждения, некротические и апоптотические изменения в белых клетках крови оценивали методом ДНК-комет. Концентрацию внеклеточной ДНК в плазме крови определяли флуориметрически, с использованием набора Quant-iT™ HS DNA Assay Kit (Invitrogen, США). Содержание 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в плазме крови определяли с помощью иммуноферментного метода с использованием набора 8-hydroxy-2-deoxyGuanosine EIA Kit (Cayman Chemical, США). Содержание каспазы-3, каспазы-9, супероксиддисмутазы и sAPO-1/FAS определяли с помощью иммуноферментного метода с использованием тест-систем фирмы Bender MedSystems (Австрия). **Результаты.** Выявлено повышение содержания свободной ДНК в плазме крови пострадавших относительно контроля на протяжении всего периода наблюдения, что обусловлено ее поступлением из клеток, поврежденных в результате травмы тканей. В первые две недели после травмы отмечено увеличение ДНК-повреждений и усиление процессов гибели белых клеток крови по некротическому и апоптотическому механизму у пострадавших с различными видами травмы, что, возможно, связано с активным участием лейкоцитов в процессах удаления продуктов клеточного распада поврежденных в результате травмы тканей и предупреждения развития инфекционных осложнений. Гибель белых клеток крови у пострадавших с травмой по некротическому пути не зависит от объема потери крови и степени гипоксии, в то время как по апоптотическому механизму выявлена интенсивность гибели лейкоцитов у этих больных от гипоксии. Вероятность развития инфекционных осложнений у пострадавших с травмой при кровопотере и гипоксии определяется количеством некротических ДНК-комет и значениями интегрального показателя на 3-й день после травмы. Количество апоптотических ДНК-комет белых клеток крови в первый день после травмы зависит от объема потери крови и степени гипоксии. Не выявлено зависимости инфекционных осложнений у пострадавших с травмой от количества апоптотических ДНК-комет в 1-й день после травмы. Выявлены различия в уровнях ДНК-повреждений, апоптоза и некроза в белых клетках крови у пострадавших с ЧМТ и ТСТ. Массивные по-

Адрес для корреспонденции:

Мягкова Екатерина Александровна
E-mail: ball.87@mail.ru

Correspondence to:

Myagkova Ekaterina Aleksandrovna
E-mail: ball.87@mail.ru

вреждения костей и тканей при тяжелой сочетанной травме сопровождается более выраженными изменениями ДНК-повреждений в первую неделю после травмы и постепенным снижением показателей ДНК-повреждений – во вторую неделю. Выявлено трехкратное снижение концентрации 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в плазме крови пострадавших с травмой, сопровождающееся и, возможно, обусловленное, увеличением количества супероксиддисмутазы. **Заключение.** Выявлена зависимость выраженности ДНК-повреждений, апоптоза и некроза от гипоксии, а также развитие инфекционных осложнений у пострадавших с гипоксией, вызванной массивной кровопотерей при тяжелой травме. **Ключевые слова:** массивная кровопотеря, гипоксия, ДНК-повреждения, лейкоциты, апоптоз, некроз, ДНК-кометы.

Objective. To study the mechanisms of posttraumatic changes in the blood cells, by investigating DNA damages associated with hypoxia caused by massive blood loss (BL) in severe injury. **Subjects and methods.** Ninety-five patients aged 40.6 ± 16.5 years (from 20 to 79 years) who had sustained severe mechanical injury with different BL volumes (BLV) (from 100 to 4000 ml) and hemodynamic disorders were examined to study DNA damages and white blood cell necrotic and apoptotic processes. In terms of the victims' weight, the mean BL was 21.5 ± 16.5 ml/kg (from 1.4 to 61.5 ml/kg). The victims were divided into 4 groups according to BLV: 1) 26 victims whose BLV was less than 750 ml (5.93 ± 2.41 ml/kg) (grade I BL); 2) 23 victims whose BLV was 750–1500 ml (11.5 ± 1.5 ml/kg) (grade 2 BL); 3) 23 victims whose BLV was 1500–2000 ml (23.8 ± 4.0 ml/kg) (grade 3 BL); 4) 23 victims whose BLV was over 2000 ml (45.6 ± 10.1 ml/kg) (grade 4 BL), according to the type of injury: 1) severe skeletal injury (SSI) ($n=17$); 2) brain injury (BI) ($n=43$); 3) a concurrence of SSI and BI (SSI+BI) ($n=35$); according to the development of infectious complications: 1) 69 victims who developed infectious complications on days 5–7 postinjury; 2) 26 victims who did not. To evaluate the impact of hypoxia on DNA damages, white blood cell apoptotic and necrotic processes, the victims were divided into 2 groups: 1) hypoxia (18 of the 95 victims who had 4 altered indicators, such as capillary blood pO_2 , plasma lactate levels, pH, and BE); 2) no hypoxia (10 of the 95 victims whose indicators were within the normal range). DNA damages and necrotic and apoptotic changes in the white blood cells were assessed by the DNA comet assay. The plasma concentration of extracellular DNA was fluorometrically determined using a Quant-iT™ HS DNA Assay Kit (Invitrogen, USA). That of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine was estimated by enzyme immunoassay employing an 8-hydroxy-2-deoxyguanosine EIA Kit (Cayman Chemical, USA). The levels of caspase-3, caspase-9, superoxide dismutase, and sAPO-1/FAS were measured by enzyme immunoassay using test systems (Bender MedSystems, Austria). **Results.** There were significantly higher plasma levels of free DNA in the victims than in the controls throughout the follow-up, which is due to its exit from the cells damaged from tissue injury. In the first two weeks after injury, there were increases in DNA damages and white blood cell alteration processes by a necrotic and apoptotic mechanism in the victims with different types of injury, which may be associated with the active participation of leukocytes in the processes of cellular breakdown product removal in the tissues damaged during injury and the in those of prevention of infectious complications. In the victims, white blood cell alteration in the necrotic pathway does not depend on BLV and hypoxia degree while that in the apoptotic pathway showed a relationship of leukocyte alteration to hypoxia in these patients. The sum of the values of necrotic DNA comets, apoptotic DNA comets, and single- and double-strand breaks on day 3 postinjury may serve as a predictor of the likely development of infectious complications in victims with injury, blood loss, and marked hypoxia. There were differences in the levels of DNA damages and white blood cell apoptosis and necrosis in the victims with BI and SSI. The injury victims showed a three-fold decrease in plasma 8-hydroxy-2-deoxyguanosine concentrations, which was accompanied and, possibly, caused by an increase in the amount of superoxide dismutase. **Conclusion.** There was a relationship between the degree of DNA damages, apoptosis, and necrosis in the white blood cells of victims with injury and hypoxia-induced blood loss. **Key words:** massive blood loss, hypoxia, DNA damages, leukocytes, apoptosis, necrosis, DNA comets.

DOI: 10.15360/1813-9779.2014.10.4.11-36

Введение

При травме или длительном воздействии патологических факторов может наступать необратимое повреждение клеток. В норме процессы пролиферации и отмирания клеток находятся в динамическом равновесии. В результате травмы и массивной кровопотери происходит сдвиг равновесия в сторону гибели клеток, что может способствовать развитию критического состояния. Общеизвестными и наиболее распространенными путями гибели клеток являются апоптоз и некроз. Некроз представляет собой патологическую форму гибели клеток, как правило, в результате острого повреждения, которое приводит к разрушению клеточных и внутриклеточных мембран, вследствие чего происходит разрушение мембран лизосом, приводящее к выходу лизосомальных ферментов, протеолизу и, в конечном счете, распаду клетки [1, 2]. Апоптоз является запрограммированным явлением клеточной гибели, вызванной как физиологическими, так и патологическими факторами [3]. Выделяют два пути развития

Introduction

Irreversible cell damage occurs after trauma or prolonged exposure of pathological factors. In norm the processes of proliferation and cell death are in dynamic equilibrium. In trauma and following the massive blood loss shifting the equilibrium toward the cell damage causes the development of the critical illness. Well-known and the most common ways of cell death include apoptosis and necrosis.

Necrosis is the pathologic form of cell death usually resulted from an acute trauma, disorders of oxidative phosphorylation, and macroergics synthesis, and mitochondrial damage, which lead to the destruction of cellular and intracellular membranes, including lysosomal membranes that lead to releasing lysosomal enzymes, proteolysis and damage of the cell nucleus (karyolysis) [1, 2].

Apoptosis is the programmed cell death phenomenon, caused by both physiological and pathological factors. [3] There are two ways of apoptosis triggered by receptor-dependent signaling and mitochondrial pathways [4].

апоптоза, запускаемого посредством рецептор-зависимого сигнального и митохондриального путей [4]. Каспазы являются эффекторными белками-протеазами, участвующими в процессах апоптоза. Митохондриальный путь реализуется в результате выхода апоптогенных белков из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму клетки [5, 6]. Процесс завершается фрагментацией клетки, образованием апоптотических телец и их фагоцитозом. Повреждение клеток при некрозе и апоптозе сопровождается попаданием свободной ДНК в плазму крови [7].

Тяжелая травма и кровопотеря приводят к нарушению микроциркуляции, снижению перфузии тканей, доставки энергетических субстратов и кислорода к тканям, компенсаторному выбросу лейкоцитов из костного мозга и кровяных депо в ответ на значительные разрушения тканей в результате травмы и кровопотери [8]. Увеличение количества лейкоцитов в плазме крови пострадавших сразу после травмы направлено на удаление продуктов клеточного распада в поврежденных тканях и профилактику инфекционных осложнений. Нейтрофильные гранулоцитарные лейкоциты вместе с мононуклеарными макрофагами относят к фагоцитирующим лейкоцитам. Способность нейтрофилов и макрофагов к фагоцитозу определяет их основную защитную функцию — очистка организма от инфекционных агентов и продуктов распада тканей, в частности, удаления продуктов клеточного распада после травмы. 60% общего числа гранулоцитов находится в костном мозге, составляя костномозговой резерв, около 40% — в различных тканях и лишь 1% — в периферической крови [9, 10]. Длительность полупериода циркуляции нейтрофильных лейкоцитов равняется 6,5 часов, затем они мигрируют в ткани, где осуществляют свою основную функцию [11]. Время жизни гранулоцитарных лейкоцитов (палочкоядерных и сегментоядерных лейкоцитов, базофилов, эозинофилов) зависит от многих причин и может колебаться от минут до нескольких дней (в среднем — 4–5 дней). Эозинофилы после созревания в костном мозге менее 1 дня находятся в циркуляции, а затем мигрируют в ткани, где продолжительность их жизни составляет 8–12 дней [12]. Тканевая фаза жизни лейкоцитов является завершающей [13].

Нарушение транспорта кислорода, сопровождающее кровопотерю, является причиной развития гипоксии у пострадавших с травмой [14]. Развитие гипоксии у пострадавших с травмой и кровопотерей происходит либо в результате нарушения доставки кислорода, либо вследствие повышенной его утилизации, либо обеих причин вместе. При тяжелой травме и массивной кровопотере обычно развивается смешанная гипоксия [15, 16]. Недостаточное поступление кислорода к тканям приводит к переходу метаболизма с аэробного на анаэробный путь. Нарушение метаболизма, нарастание гипоксии может приводить к повреждению ДНК, гибели клеток по апоптотическому или некротическому механизму. Повреждения ДНК происходят с образованием 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина, щелоч-

Caspase are effector proteins-proteases that involved in the apoptotic process. Mitochondrial pathway includes the release of apoptogenic proteins from intramembranous space of mitochondria to the cytoplasm. [5, 6] The process is completed by fragmentation of nuclei and formation of apoptotic bodies that are phagocytosed by macrophages and neutrophils. Damage of cells during apoptosis and necrosis is accompanied by a release of cell-free DNA in blood plasma [7]. In severe trauma and blood loss, the processes of massive cell death lead to microcirculatory disturbances, decrease of tissue perfusion, failing delivery of energy substrates and oxygen to the tissues. The another consequence of blood loss in trauma includes a compensatory release of leukocytes from the bone marrow and blood depot [8].

The increased number of leukocytes in blood plasma of patients after trauma is directed to removal of cell dissolution products in the damaged tissues and to prevention of infectious complications. Neutrophilic granulocytes and mononuclear macrophages are considered as main phagocytic leukocytes. The ability of neutrophils and macrophages to phagocytosis determines their basic protective function — cleaning the body from infectious agents and dissolution products of tissue, in particular the removal of cell dissolution products after trauma. Nearly 60% of total granulocytes are located in bone marrow (bone marrow reserve), about 40% are located in various tissues, and only 1% are circulating in the peripheral blood [9, 10]. Duration halftime of circulation of neutrophils is 6.5 hours, and then they migrate to the tissues to function. [11] Lifetime of granulocytes (stab and segmental leucocytes, basophils, eosinophils) depends on multiple factors and may vary from minutes to a few days (4–5 days in average). Eosinophils after maturation in the bone marrow are maintained less than one day in the circulation and then migrate into tissues, where the lifetime is 8–12 days [12]. Tissue phase of life is the final phase of leukocytes [13].

Disorder of oxygen transport that accompanied blood loss is the cause of the development of hypoxia in patients with trauma [14]. Development of hypoxia in patients with trauma and blood loss occurs either as a result of oxygen delivery disorder, either because of increase its utilization, or due to both reasons together. After severe trauma and massive blood loss patients usually develop mixed hypoxia [15, 16]. Insufficient tissue supply of oxygen leads to a transition from aerobic metabolism to anaerobic way. Metabolic disorder and increasing hypoxia might lead to increased DNA damage and cell death via apoptotic or necrotic mechanisms. The main DNA damages include the modification of DNA and nucleosides with 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, appearance of alkaline-labile sites and single-, double strand breaks [17]. Increased concentration of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as a specific product of oxidative DNA damage is considered as one of the biomarkers of oxidative distress [18–22].

Study of DNA damage and cell death pathways in patients with trauma is crucial for determining the pathophysiological mechanisms of the post-trauma critical ill-

Injury. Blood loss

но-лабильных сайтов и одно-, двунитевых разрывов [17]. Увеличение количества 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина — специфического продукта окислительного повреждения ДНК — может рассматриваться как один из биомаркеров окислительного дистресса [18–22].

Изучение ДНК-повреждений и путей гибели клеток у пострадавших с травмой является важным для определения патофизиологических механизмов развития критических состояний и коррекции этих нарушений.

Цель исследования — изучить механизмы развития посттравматических изменений в клетках крови путем исследования ДНК-повреждений, связанных с гипоксией, вызванной массивной кровопотерей при тяжелой травме.

Материал и методы

Для исследования ДНК-повреждений, процессов некроза и апоптоза белых клеток крови было обследовано 95 больных в возрасте 40,6±16,5 лет (от 20 до 79 лет), перенесших тяжелую механическую травму с различными объемами потери крови (от 100 до 4000 мл) и нарушениями гемодинамики: 67 мужчин, 28 женщин; 59 выживших, 36 умерших. Среднее значение потери крови (ПК) с учетом веса пострадавших составило 21,5±16,5 мл/кг (от 1,4 до 61,5 мл/кг).

Больные поступали в реаниматологическое отделение через 9,1±5,1 (от 2 до 13) часа после травмы.

В зависимости от объема потери крови пострадавшие были разделены на четыре группы:

КП I СТ (кровопотеря I степени тяжести) — 26 пострадавших, объем потери крови (ОПК) составил меньше 750 мл (5,93±2,41 мл/кг);

КП II СТ (кровопотеря II степени тяжести) — 23 пострадавших, ОПК составил 750–1500 мл (11,5±1,5 мл/кг);

КП III СТ (кровопотеря III степени тяжести) — 23 пострадавших, ОПК составил 1500–2000 мл (23,8±4,0 мл/кг);

КП IV СТ (кровопотеря IV степени тяжести) — 23 пострадавших, ОПК составил более 2000 мл (45,6±10,1 мл/кг).

Оценку потери крови учитывали в зависимости от локализации и объема травмы, по показателям шокового индекса (отношение артериального давления к частоте сердечных сокращений) и с учетом артериального давления, центрального венозного давления, частоты сердечных сокращений, частоты дыхательных движений, почасового диуреза, уровня сознания [23, 24]. Кровопотерю во время оперативных вмешательств определяли гравиметрическим методом [25]: интраоперационная кровопотеря = (вес салфеток, пропитанных кровью — вес сухих салфеток) + количество аспирированной из раны крови.

В зависимости от вида травмы пострадавшие были разделены на три группы:

ТСТ (тяжелая скелетная травма) — 17 пострадавших;

ЧМТ (черепно-мозговая травма) — 43 пострадавших.

Двадцать шесть (60%) пострадавших получили черепно-мозговую травму в результате насильственных действий, 14 (33%) — вследствие дорожно-транспортных происшествий. Причина черепно-мозговой травмы у 3 (7%) больных была связана с развитием судорожного припадков;

ТСТ+ЧМТ (сочетание тяжелой скелетной и черепно-мозговой травм) — 35 пострадавших.

В зависимости от развития инфекционных осложнений пострадавшие были разделены на две группы:

Инфекция «+» — 69 пострадавших, у которых на 5–7-е сутки после травмы развились инфекционные осложнения;

Инфекции «-» — 26 пострадавших.

В таблице 1 представлены группы пострадавших в зависимости от вида травмы, степени тяжести кровопотери и наличия гипоксии с указанием объема потери крови, тяжести со-

ness development and developing therapeutic strategies to fight these disorders.

Objective: to study the mechanisms of posttraumatic changes in blood cells through determining the types of DNA damage and cell death associated with hypoxia caused by massive blood loss.

Materials and Methods

To investigate the DNA-damage, necrosis and apoptosis processes of white blood cells were examined and characterized in 95 patients of average age of 40,6±16,5 years (20 – 79 years) at an average body mass of 72,8±6,6 kg (60–95 kg) after severe mechanical trauma with varied volumes of blood loss (100–4000 ml) and hemodynamic disorders. The cohort included 67 men, 28 women, of which 59 survivors and 36 deceased patients. Mean blood loss (BL) adjusted to body weight was 21,5±16,5 ml/kg varying from 1.4 to 61.5 ml/kg.

Patients were admitted to intensive care unit in 9,1±5,1 (-2–13) hours after the trauma.

All patients were divided in four groups depending on a volume of the blood loss [23] as following:

I DBL (degree I of blood loss) — 26 patients, the amount of blood loss (ABL) was less than 750 ml (5,93±2,41 ml/kg).

II DBL (degree II of blood loss) — 23 patients, ABL was 750–1500 ml (11,5±1,5 ml/kg).

III DBL (degree III of blood loss) — 23 patients, ABL was 1500–2000 ml (23,8±4,0 ml/kg).

IV DBL (degree IV of blood loss) — 23 patients, ABL was more than 2000 ml (45,6±10,1 ml/kg).

The degree of BL was determined in relation to the site and extent of injury, blood pressure, central venous pressure, heart rate, shock index (blood pressure/heart rate ratio), respiratory rate, hourly diuresis, and the level of consciousness [23, 24]. The volume of BL during surgery was estimated by a gravimetric method [25]: intraoperative blood loss=(the weight of intraoperative blood soaked specimens — dry specimens) + aspirated wound blood (using aspiration catheter).

All patients also were divided into three groups according to the type of trauma:

SCT (severe concomitant trauma) — 17 patients.

TBI (traumatic brain injury) — 43 patients. Twenty-six (60%) patients had a brain injury as a result of violence, 14 (33%) — as a result of road accidents. Cause of traumatic brain injury in 3 (7%) patients was associated with seizures.

SCT + TBI (combination of severe concomitant and brain traumas) — 35 patients.

All patients were divided into two groups according to the development of infectious complications:

Infection «+» group included those patients who developed infectious complications post-trauma on days 5–7 (69 patients)/Infection «-» group included patients with no infection (26 patients).

Table 1 presents the patients depending on the type of trauma, severity of blood loss and presence of hypoxia based on the amount of blood loss, the severity of illness by APACHE II, development of infectious complications, and number of survived and deceased patients.

To assess the effect of hypoxia on DNA damage, apoptosis and necrosis of white blood cells two main groups were formed based on the values of four indicators, which reflect changes in the presence or absence of hypoxia (pO₂ in the capillary blood, lactate levels, pH and BE plasma).

Hypoxia «+» — 18 patients with changed four parameters (pO₂ in the capillary blood, lactate levels, pH and BE of blood plasma) at admission to intensive care unit.

Hypoxia «-» — 10 patients with all 4 parameters (pO₂ in the capillary blood lactate levels, pH and BE of blood plasma) in norm at admission.

Таблица 1. Характеристика групп пострадавших в зависимости от вида травмы, степени тяжести кровопотери и наличия гипоксии.**Table 1. Characterization of patients depending on the type of trauma, severity of a blood loss and presence of hypoxia**

General group, n=95	SCT, n=17	TBI, n=43	SCT+TBI, n=35
ABL – 21,5±16,5 ml/kg;	ABL – 33,3±14,6 ml/kg	ABL – 9,0±6,6 ml/kg	ABL – 31,1±15,1 ml/kg
APACHE II – 20,7±2,7;	APACHE II – 21,9±3,3	APACHE II 20,0±2,5	APACHE II 20,9±2,6
Infection «+», n=69	Infection «+», n=13	Infection «+», n=31	Infection «+», n=25
Infection «-», n=26	Infection «-», n=4	Infection «-», n=12	Infection «-», n=10
59s/36d	13s/4d	23s/20d	26s/11d
I DBL, n=26	n=1	n=24	n=1
ABL – 5,93±2,41 ml/kg,	ABL – 10 ml/kg	ABL – 5,8±2,4 ml/kg	ABL – 5,5 ml/kg
APACHE II – 20,1±2,8;	APACHE II 16	APACHE II 20,3±2,8	APACHE II 20
Infection «+», n=17	Infection «-», n=1	Infection «+», n=16	Infection «+», n=1
Infection «-», n=9	1s	Infection «-», n=8	1s
16s/10d		14s/10d	
II DBL, n=23	n=2	n=18	n=3
ABL – 11,5±1,5 ml/kg	ABL – 13,2±3,0 ml/kg	ABL – 11,3±1,2 ml/kg	ABL – 11,6±2,4 ml/kg
APACHE II 19,3±1,4	APACHE II 19,0±1,4	APACHE II 19,3±1,5	APACHE II 23,1±1,2
Infection «+», n=17	Infection «+», n=1	Infection «+», n=14	Infection «+», n=2
Infection «-», n=6	Infection «-», n=1	Infection «-», n=4	Infection «-», n=1
13s/10d	2s	9s/9d	2s/1d
III DBL, n=23	n=3	–	n=20
ABL – 23,8±4,0 ml/kg	ABL – 22,9±3,7 ml/kg		ABL – 24,0±4,2 ml/kg
Infection «+», n=15	APACHE II 22±4		APACHE II 20,8±2,3
Infection «-», n=8	Infection «+», n=3		Infection «+», n=12
APACHE II 20,3±2,6	3s		Infection «-», n=8
20s/3d			s17/3d
IV DBL, n=23	n=11	n=1	n=11
ABL – 45,6±10,1 ml/kg	ABL – 42,0±9,4 ml/kg	ABL – 46,1 ml/kg	ABL – 48,6±10,4 ml/kg
APACHE II 23,1±2,4	APACHE II 22,9±2,7	APACHE II 25	APACHE II 23,1±2,3
Infection «+», n=20	Infection «+», n=9	Infection «+», n=1	Infection «+», n=10
Infection «-», n=3	Infection «-», n=2	1d	Infection «-», n=1
10s/13d	7s/4d		4s/7d
Нуроксия «+», n=18	n=4	n=5	n=9
ABL – 25,2±16,9 ml/kg	ABL – 38,2±9,8 ml/kg	ABL – 9,1±2,3 ml/kg	ABL – 28,3±17,6 ml/kg
APACHE II 21,0±2,3	APACHE II 22,0±2,8	APACHE II 20,4±2,6	APACHE II 20,8±2,0
Infection «+», n=13	Infection «+», n=2	Infection «+», n=4	Infection «+», n=7
Infection «-», n=5	Infection «-», n=2	Infection «-», n=1	Infection «-», n=2
I DBL, n=3; II DBL, n=4;	IV DBL, n=4	I DBL, n=2; II DBL, n=3;	I DBL, n=1; II DBL, n=1;
III DBL, n=5; IV DBL, n=6	3s/1d	3s/2d	III DBL, n=5; IV DBL, n=2
13s/5d			7s/2d
Нуроксия «-», n=10	–	n=6	n=4
ABL – 11,8±6,3 ml/kg		ABL – 7,9±1,9 ml/kg	ABL – 17,6±6,2 ml/kg
APACHE II 19,8±2,4		APACHE II 20,6±2,7	APACHE II 18,5±1,0
Infection «+», n=9		Infection «+», n=6	Infection «+», n=3
Infection «-», n=1		I DBL, n=4; II DBL, n=2;	Infection «-», n=1
I DBL, n=4; II DBL, n=3;		6s	II DBL, n=1; III DBL, n=3;
III DBL, n=3.			4s
9s/1d			

Note (Примечание): General group – общая группа; DBL – degree of blood loss (степень тяжести кровопотери); ABL – amount of blood loss (объем потери крови); SCT – severe concomitant trauma (тяжелая скелетная травма); TBI – traumatic brain injury (черепно-мозговая травма); s – survivors (выжившие); d – deceased patients (умершие). Нуроксия «+» – гипоксия «+»; Нуроксия «-» – гипоксия «-»; Infection «+» – инфекция «+»; APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II) – шкала тяжести пострадавших.

стояния по APACHE II, развитию инфекционных осложнений и числа выживших и умерших больных.

Для оценки влияния гипоксии на ДНК-повреждения, процессы апоптоза и некроза белых клеток крови общая группа пострадавших с травмой была разделена на 2 группы с учетом значений 4-х показателей, изменения которых отражают наличие или отсутствие гипоксии: pO_2 в капиллярной крови, уровень лактата, pH и VE плазмы крови.

Гипоксия «+» – 18 пострадавших, у которых при поступлении в реаниматологическое отделение были изменены все 4 показателя (pO_2 в капиллярной крови, уровень лактата, pH и VE плазмы крови);

Гипоксия «-» – 10 пострадавших, у которых при поступлении в реаниматологическое отделение все 4 показателя

The major surgical interventions, such as laparotomy, arrest of intraabdominal bleeding, closure of damaged organ ruptures, craniotomy, removal of intracranial hematoma, stabilization of bone fragments with an external fixator or a plaster splint, skeletal traction were performed during the first 24 hours following trauma. Patients underwent intramedullary osteosynthesis when their condition became stable.

According to the degree of BL and the type of dishydrata, all the patients were administered with infusions of packed red blood cells and fresh-frozen plasma, balanced saline solutions (disolum, trisolum) for the correction of blood electrolytes and colloidal solutions (hydroxyethyl starch, voluven, hyperHAES) to replenish volume of circulating blood and to maintain osmotic pressure.

Injury. Blood loss

(pO_2 в капиллярной крови, уровень лактата, pH и BE плазмы крови) были в пределах нормы.

Основные оперативные вмешательства: лапаротомия, установка внутрибрюшного кровотечения, ушивание разрывов поврежденных органов, трепанация черепа, удаление внутричерепной гематомы, стабилизация костных отломков с наложением гипсовой лонгеты, формирование скелетного вытяжения — выполняли в первые сутки. При стабилизации состояния больных проводили остеосинтез.

В зависимости от объема потери крови и вида дисгидрии всем больным вводили эритроцитарную массу и свежемороженную плазму, сбалансированные солевые растворы (дисоль, трисоль) для коррекции электролитов крови и коллоидные растворы (гидроксиэтилкрахмал, волювен, гиперХАЕС) для восполнения объема циркулирующей крови и поддержания осмотического давления.

В реаниматологическом отделении проводили антибактериальную терапию (при поступлении — антибактериальные препараты цефалоспоринового ряда третьего поколения; в дальнейшем проводили коррекцию антибактериальной терапии в соответствии с полученным результатом микробиологического исследования бронхоальвеолярных смывов), профилактику образования язв (церукал, омез) и тромботических осложнений (гепарин, клексан), респираторную поддержку.

Семидесяти пяти (79%) из 95 пострадавших проводилась респираторная поддержка аппаратом Dräger Savina (Dräger, Германия) с момента поступления в реаниматологическое отделение. Ее средняя продолжительность составила $8,4 \pm 5,1$ суток. В группе выживших больных продолжительность респираторной поддержки составила $8,7 \pm 5,4$ суток, в группе умерших — $7,8 \pm 4,6$ суток. Для улучшения санации трахеобронхиального дерева на фоне продленной искусственной вентиляции легких 71-му (75%) больному из всей группы пострадавших на третьи сутки была выполнена срединная трахеостомия. Двадцать четыре (25%) из 95 пострадавших была произведена экстубация трахеи после основных оперативных вмешательств с последующим проведением неинвазивной вентиляции легких.

Для восполнения энергетических потерь организма пострадавшим с тяжелой сочетанной травмой ежедневно вводили 400–800 мл 10% раствор глюкозы. Основная масса вводимых растворов приходилась на первые трое суток пребывания больных в реаниматологическом отделении.

Начиная со 2-х суток все больные получали энтеральное питание сбалансированными смесями (Нутриэн Стандарт из расчета 2–2,5 л в сутки, дробно, с контролем усвоения) через установленный назогастральный зонд.

Клинико-лабораторная характеристика пострадавших. При поступлении в стационар всем пострадавшим проводили гематологическое (гематологический анализатор — ABX Micros 60, Heriba ABX Diagnostics, Франция) исследование крови: эритроциты, гемоглобин, гематокрит, лейкоциты. Концентрацию глюкозы и лактата в плазме крови определяли электрохимическим методом на анализаторе Biosen-S-Line (EKF Diagnostics, Германия) с использованием чип-сенсоров (EKF Diagnostics, Германия). Определение биохимических показателей плазмы крови (общий белок, мочевины, креатинин, общий билирубин, прямой билирубин, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаратаминотрансфераза (АСТ) производили на биохимическом анализаторе SAPPHIRE-400 (Tokyo Boeki, Япония).

Динамику клинико-лабораторных показателей оценивали с учетом данных, полученных на 1-е, 3-и, 5-е, 7-е и 15-е сутки.

В первый день наблюдения у всех пострадавших при поступлении в реаниматологическое отделение регистрировали признаки травматического шока, проявляющиеся следующими клинико-лабораторными показателями: сниженное АДср ($64,3 \pm 11,9$ мм рт. ст.), синусовая тахикардия (ЧСС = 110 ± 15 ударов в минуту), метаболический ацидоз [pH 7,3 (7,29; 7,39), BE -3,05 (-6,9; -0,3) ммоль/л], гипоксемию [pO_2 62,9 (49,2;

All the patients in the intensive care unit received antibiotics (third-generation cephalosporins on admission, then antibacterial therapy adjusted according to the results of microbiological tests), prevention of ulceration (omeprazole) and thrombotic events (heparin, clexane), and respiratory support.

Seventy-five (79%) from the 95 patients received respiratory support using a Dräger Savina ventilator (Dräger, Germany) after admission to intensive care unit. Average duration of support was $8,4 \pm 5,1$ days, specifically, $8,7 \pm 5,4$ days in patients who survived, and $7,8 \pm 4,6$ days in a group of patients who died. Seventy one (75%) of all patients received median tracheostomy on the third day to improve the sanitation of the tracheobronchial tree against prolonged artificial ventilation. In twenty-four (25%) of 95 patients tracheal extubation after major surgical procedures was performed.

The patients with SCT were infused with 10% glucose solution (400–800 ml) per day to replenish the body energy. The bulk of the solutions were infused within the first three days of the patients' unit stay.

On day 2, all patients received balanced enteral nutrition formulas (Nutrient Standard, Nutritek, Russia), up to 2.0–2.5 liters daily, intermittently, under the control of the volume of food absorption.

The results of clinical and laboratory studies

On admission, blood tests (red and white blood cells, hemoglobin, hematocrit) were performed in all patients with the aid of ABX Micros 60 Hematology analyzer (Heriba ABX Diagnostics, France). Plasma glucose and lactate concentrations were electrochemically measured by a Biosen-S-Line analyzer using chip sensors (EKF Diagnostics, Germany). Concentrations of protein, urea, creatinine, total bilirubin, direct bilirubin, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) were determined by biochemical analyzer SAPPHIRE-400 (Tokyo Boeki, Japan).

The time course of clinical and laboratory changes were estimated on the basis of the data obtained on days 1, 3, 5, 7, and 15.

On the first day of observation in all patients at admission the following parameters were recorded: reduced ABP ($64,3 \pm 11,9$ mm Hg), sinus tachycardia (heart rate = 110 ± 15 beats per minute), metabolic acidosis [pH 7.3 (7.29, 7.39), BE -3.05 (-6.9, -0.3) mmol/L], hypoxemia [pO_2 62.9 (49.2, 83.5) mm Hg], hyperlactatemia [2.9 (1.96, 4.65) mmol/L], decreased level of consciousness [GCS score $11 \pm 7,9$].

On admission all patients experienced a decrease in hemoglobin level [124 (98, 134) g/l], hematocrit [35 (28, 39)%], the number of erythrocytes [$4.06 (3.28, 4.38) \times 10^{12}$] and increase in number of white blood cells [$15.6 (10.9, 20.9) \times 10^9$], glucose [8.27 (6.58, 10.70) mmol/L], ALT [69.3 (36.5; 127.9) IU/L] and AST [124.1 (53.0, 213.7) IU/L] in blood presumably due to cytolysis as a result of tissue damage on the first day after trauma.

On the third day after trauma patients exhibited decreased hemoglobin level [80 (67, 98) g/L] and number of erythrocytes [$2.57 (2.21, 3.24) \times 10^{12}$] most likely due to hemodilution by massive infusions and transfusions. Administration of buffer solutions and mechanical ventilation resulted in pH normalization to 7.44 (7.39, 7.48), increased oxygen tension [69.1 (56.5, 118.15) mm Hg], correction of base deficit [-0.1 (-3.2, 2.05) mmol/L] and decreasing the number of leucocytes to $9.2 (7.7, 12.4) \times 10^9$.

On days 5 and 7 after the trauma inspite of respiratory support and surgical interventions, 66 from the 95 patients developed secondary infectious complications associated with a lack of a motor activity. Infections included purulent bronchitis (49 patients, 74.2%), nosocomial pneumonia (35 patients, 53%), secondary purulent meningitis (6 patients, or 9% of patients with TBI and SCT).

The level of stab neutrophils from patients with infectious complications on day 5 was 8.0 (5.0, 10.0)% whereas in patients without infectious complications it decreased to 4.5 (4.0, 6.0)% (P.....).

83,5) мм рт. ст.], гиперлактатемия [2,9 (1,96; 4,65) ммоль/л], снижение уровня сознания [ШКГ $11 \pm 7,9$ баллов].

У всех пострадавших при поступлении отмечалось снижение уровня гемоглобина [124 (98; 134) г/л], гематокрита [35 (28; 39)%], количества эритроцитов [4,06 (3,28; 4,38) $\times 10^{12}$], повышение количества лейкоцитов [15,6 (10,9; 20,9) $\times 10^9$], гипергликемия [8,27 (6,58; 10,70) ммоль/л], увеличение уровня АЛТ [69,3 (36,5; 127,9) МЕ/л], АСТ [124,1 (53,0; 213,7) МЕ/л], вследствие цитолиза в результате прямого повреждения тканей в первые сутки после травмы.

На 3-и сутки после травмы в связи с проведением массивной инфузионно-трансфузионной терапии у пострадавших отмечалось дальнейшее снижение уровня гемоглобина [80 (67; 98) г/л] и количества эритроцитов [2,57 (2,21; 3,24) $\times 10^{12}$] вследствие гемодилюции. На фоне проведения искусственной вентиляции легких, введения буферных растворов на 3-й день наблюдения отмечалась нормализация рН до 7,44 (7,39; 7,48), повышение напряжения кислорода [69,1 (56,5; 118,15) мм рт. ст.], коррекция дефицита оснований [-0,1 (-3,2; 2,05) мМ/л], снижение количества лейкоцитов [9,2 (7,7; 12,4) $\times 10^9$].

На 5-е и 7-е сутки после травмы, на фоне проведения респираторной поддержки, оперативных вмешательств, отсутствия двигательной активности, у 66 из 95 пострадавших развились вторичные инфекционные осложнения: гнойный трахеобронхит — у 49 (74,2%), нозокомиальная пневмония — у 35 (53%) из 66 пострадавших, вторичный гнойный менингит — у 6 (9%) пострадавших с ЧМТ и ЧМТ+ТСТ.

Уровень палочкоядерных нейтрофилов у пострадавших с развившимися инфекционными осложнениями на 5-е сутки составил 8,0 (5,0; 10,0)%, у пострадавших без инфекционных осложнений — 4,5 (4,0; 6,0)%.

На 7-е сутки после травмы в общей группе пострадавших имелись следующие значения гематологических показателей: количество лейкоцитов — 9,7 (6,3; 10,75) $\times 10^9$, эритроцитов — 2,76 (2,59; 3,16) $\times 10^{12}$, уровень гемоглобина — 85,0 (75,5; 93,5) г/л.

К 15-м суткам отмечали повышение уровня гемоглобина [92 (85; 100) г/л], увеличение количества эритроцитов [3,13 (2,79; 3,33) $\times 10^{12}$]. При восстановлении сознания, стабилизации состояния и клинико-лабораторных показателей больные отключались от аппарата ИВЛ.

В группе пострадавших с изолированной ЧМТ при поступлении отмечались бради- либо тахикардия, артериальная гипертензия, расстройство частоты и ритма дыхания.

У 10 (23%) пострадавших с ЧМТ на 3–5-сутки были обнаружены менингеальные симптомы, по результатам цитологического исследования ликвора, у данных больных был выявлен вторичный гнойный менингит. У 18 из 43 пострадавших с ЧМТ на 5-е, 7-е сутки развились гнойный трахеобронхит и/или рентгенологическая и клиническая картина нозокомиальной пневмонии. У 3 (6,9%) пострадавших с черепно-мозговой травмой развились признаки посттравматического несахарного диабета, который проявлялся полиурией в сочетании с нарастающей гипернатриемией и низкой осмолярностью мочи, развившихся в рамках дислокации головного мозга. В первую неделю после травмы уровень глюкозы у пострадавших с ЧМТ был выше нормы.

Тридцати двум (74%) из 43 больных с ЧМТ проводилась постоянная вазопрессорная поддержка для обеспечения адекватного церебрального перфузионного давления, а также медикаментозная седация с целью снижения повышенного внутричерепного давления и энергозатрат. Для снижения повышенного внутричерепного давления больным вводили маннитол под контролем электролитов крови и проводили умеренную гипервентиляцию под контролем газов артериальной крови.

Метод оценки ДНК-повреждений. ДНК-повреждения, некротические и апоптотические изменения в белых клетках крови оценивали методом ДНК-комет [26]. Забор крови для исследования белых клеток крови проводили в группе сравнения однократно из локтевой вены, у пострадавших — из подключичной вены в дни исследования. Образцы крови (2 мл) смешивали с

On day 7 after the trauma patients experienced the following haematological values: leucocytes — 9.7 (6.3, 10.75) $\times 10^9$, erythrocytes — 2.76 (2.59, 3.16) $\times 10^{12}$, hemoglobin level — 85.0 (75.5, 93.5) g/l.

On day 15 an increase in hemoglobin level [92 (85, 100) g/l] and number of red blood cells [3.13 (2.79, 3.33) $\times 10^{12}$] became evident. When the consciousness and stabilization of the clinical and laboratory parameters were recovered, patients were disconnected from the ventilator.

In patients with isolated TBI at admission bradycardia or tachycardia, hypertension, disorders of rate and rhythm of breathing were revealed.

In 10 (23%) patients with TBI on days 3–5 the meningeal symptoms were diagnosed. According to the cerebrospinal fluid cytology, it was a secondary purulent meningitis. Eighteen of 43 patients with TBI developed purulent bronchitis and/or radiological and clinical picture of nosocomial pneumonia on days 5 or 7. Three (6.9%) patients with traumatic brain injury were diagnosed with signs of post-traumatic insipidus diabetes, which was manifested by polyuria combined with increasing hypernatremia and low osmolarity of urine, and had been developed because of brain dislocation. In the first week after trauma the glucose levels in patients with head injury were higher than normal.

Thirty-two (74%) of 43 patients with TBI received constant vasopressor support to ensure adequate cerebral perfusion pressure, combined with sedation to reduce elevated intracranial pressure and energy consumption. Mannitol was administered to reduce elevated intracranial pressure under electrolyte levels control, and moderate hyperventilation under the control of arterial blood gases was performed.

Method of DNA damage assessment.

DNA damage, necrotic and apoptotic changes in white blood cells were assessed by comet assay [26]. Blood samples from the control group were harvested from cubital vein only once, whereas the samples from patients were harvested from the subclavian vein on indicated days of the study.

Blood samples (2 ml) were mixed with an equal volume of RPMI-1640 medium containing 10% DMSO, frozen and stored prior to analysis at -20°C. Fifty μ l of blood were added to the tubes each containing 0,5 ml of 1% agarose solution, then the mixture was resuspended and transferred onto agarose-coated slides. After consolidation of agarose slides were treated by a chilled buffer (10 mM Tris-HCl [pH 10], 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA-Na₂, 1% TritonX-100, 10% DMSO) for at least 1 hour followed by electrophoresis in alkaline and neutral versions. In neutral version the slides were subjected to electrophoresis in Tris-borate buffer (pH 8.0) for 10 minutes at a field strength 1 V/cm. In alkaline versions slides were incubated in a electrophoresis buffer that contained 300 mM NaOH, 1 mM EDTA-Na₂, pH > 13 for 20 minutes to denature the DNA and detect alkaline-labile sites. Electrophoresis was performed at a field 1V/cm and current strength ~ 300 mA for 20 min. Then, the electrophoresis slides were fixed with a 70% ethanol, dried and stored at a room temperature until DNA comet image analysis.

Immediately prior to microscopy, the slides were stained with a fluorescent dye SYBRGreenI (1:10000 in TE buffer) for 30 min. Analysis was performed using epifluorescence microscope Micmed 2-12T («Lomo», Russia), combined with a high-resolution digital camera (VEC-335, «EMU», Russia), at $\times 400$. Images of DNA comets were obtained by micropreparations and analyzed using software CASP 1.2.2 (CASPLab, USA). As an indicator of DNA damage, the percentage of DNA in the tail related to the total amount of DNA in the comet was calculated.

Apoptotic DNA comets were identified as specific «DNA comet» with diffuse «tail» and almost missing «head»; necrotic comets were identified as broad diffuse «DNA comet» with irregular shape [27]. These atypical DNA comets were considered as resulted from apoptotic or necrotic cell death, respectively.

Injury. Blood loss

равным объемом среды RPMI-1640, содержащей 10% диметилсульфоксида, замораживали и хранили до анализа при минус 20°C. Образцы крови в объеме 50 мкл вносили в пробирки с 500 мкл 1% раствора агарозы, ресуспендировали и наносили на предварительно покрытые агарозой предметные стекла. После затвердевания агарозы микропрепараты лизировали охлажденным буфером (10 mM Tris-HCl [pH 10], 2.5 mM NaCl, 100 mM EDTA-Na₂, 1% TritonX-100, 10% DMSO) не менее 1 часа. После окончания лизиса проводили электрофорез в щелочной и нейтральной версиях. В нейтральной версии по окончании лизиса микропрепараты подвергали электрофорезу в Трис-боратном буфере (pH 8.0) в течение 10 минут при напряженности поля 1V/cm. В щелочной версии микропрепараты инкубировали буфером для электрофореза, содержащим 300 mM NaOH, 1 mM EDTA-Na₂, pH > 13 в течение 20 минут для щелочной денатурации ДНК и выявления щелочно-лабильных сайтов. Электрофорез проводили в течение 20 минут при напряженности поля 1 V/cm и силе тока ~300 mA. По окончании этапа электрофореза микропрепараты фиксировали в 70% растворе этилового спирта, высушивали до анализа при комнатной температуре.

Непосредственно перед микроскопированием препараты окрашивали флуоресцирующим красителем SYBRGreenI (1:10000 в TE-буфере) в течение 30 мин. Анализ проводили на эпифлуоресцентном микроскопе Микмед-2 12Т («Ломо», Россия), совмещенном с цифровой камерой высокого разрешения (VEC-335, «ЭВС», Россия), при увеличении ×400. Полученные с микропрепаратов изображения ДНК-комет анализировали с использованием программного обеспечения CASP 1.2.2 (CASPLab, USA). В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте от общего количества ДНК в комете.

Апоптотические ДНК-кометы идентифицировали как специфичные «ДНК-кометы» с диффузным «хвостом» и практически отсутствующей «головой», а некротические — как широкие диффузные «ДНК-кометы» неправильной формы [27]. Выявление таких атипичных ДНК-комет можно рассматривать как косвенный показатель, соответственно, апоптотической или некротической гибели клеток.

Использование щелочного варианта метода ДНК-комет позволяет интегрально оценивать выход одно- и двунитевых разрывов и щелочно-лабильных сайтов. Методом ДНК-комет, проводимым в нейтральных условиях среды, детектируют преимущественно двунитевые разрывы ДНК. Степень поврежденности ДНК оценивается по увеличению количества мигрировавшей ДНК после проведения электрофореза ДНК иммобилизованных в агарозе отдельных клеток.

Концентрацию внеклеточной ДНК в плазме крови определяли флуориметрически, с использованием набора Quant-iT™ HS DNA Assay Kit (Invitrogen, США).

Содержание 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в плазме крови определяли с помощью иммуноферментного метода с использованием набора 8-hydroxy-2-deoxyGuanosine EIA Kit (Cayman Chemical, США).

Содержание каспазы-3, каспазы-9, супероксиддисмутазы и sAPO-1/FAS, определяли с помощью иммуноферментного метода с использованием тест-систем фирмы Bender MedSystems (Австрия).

В группу сравнения вошли 8 доноров в возрасте 28,5±3,4 (от 25 до 35) лет, $p < 0,05$ относительно группы пострадавших. Со слов добровольцев, до взятия анализа они не принимали никаких препаратов, алкогольных напитков и отрицали факт наличия каких-либо заболеваний. Значения лабораторных данных и данных, полученных методом ДНК-комет у здоровых добровольцев, приняты за норму.

Исследование выполняли с согласия этического комитета НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского РАМН.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA) и Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA) с использованием принципов математического анализа медико-биологических исследова-

Alkaline comet assay allows the evaluation of the integral output of one- and double-strand breaks and alkali-labile sites. Comet assay conducted in neutral environments detected mainly damaged DNA with double strand breaks. DNA damage is assessed by an increase in the number of migrated DNA after electrophoresis of DNA of immobilized individual cells in agarose.

The concentration of extracellular DNA in plasma was determined fluorimetrically, with using a set of Quant-iT™ HS DNA Assay Kit (Invitrogen, USA).

The content of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in plasma was determined by ELISA using 8-hydroxy-2-deoxyGuanosine EIA Kit (Cayman Chemical, USA).

Quantification of caspase-3, caspase-9, and superoxide dismutase and sAPO-1/FAS in plasma was determined by ELISA-based test systems from Bender MedSystems (Austria).

A comparison group consisted of eight apparently healthy volunteers aged 28.5±3.4 years (from 25 to 35 years, $p < 0.05$ versus patients group). The volunteers reported that they had taken neither drugs nor alcohol before blood sample harvesting and had no history of any diseases. The data obtained by DNA-comet method in healthy volunteers were accepted as a standard.

The investigation was conducted by the consent of the Ethics Committee of the V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences and followed the Helsinki Declaration.

The data were statistically processed using Microsoft Excel and Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA) according to basic requirements for medical and biological data processing [28]. Arithmetic mean (M) and standard deviation (σ) were computed, and the distribution was checked for normality. The median (MD) and the interquartile range (IQR) were used for data, distribution of which did not meet normal distribution. The nonparametric Wilcoxon test was used to check the statistical hypotheses when compared the groups. Prediction of infectious complications was determined by logistic regression. The values were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Patients with decompensated somatic diseases: cardiovascular, diabetes, with inoperable malignant tumors were excluded from the study.

Results and Discussion

Free extracellular DNA in plasma

Extracellular DNA concentration in the blood plasma of patients with severe trauma was higher in comparison to the control during the first two weeks of observation presumably due to the output of DNA from damaged cells by trauma. [29]

Significant increase in concentration of free DNA in the blood plasma of patients with severe trauma was revealed on day 1 [1.51 (1.22, 1.94) pg/ml] and day 3 [1.62 (1.23, 1.83) ug/ml, $P < 0.05$] when compared to the control group [0.85 (1.06, 0.83) ug/ml].

Gradual slight increase in concentration of extracellular DNA in plasma during the first week of observation [1.71 (1.23, 1.92) pg/ml] was observed on day 7 after the trauma. Most likely, this increase was due to intensification of liquidating post-trauma processes of removing of cellular disintegration products liberated from damaged tissues.

During the second week of observation a gradual decrease of this index with a return to its initial value [1.56 (1.20, 1.73) pg/ml] to day 15 was observed that was likely

ний [28]. Для полученных данных, распределение которых, в вариационном ряду носило нормальный характер, были использованы среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (σ), а для данных, не отвечающих нормальному распределению, определяли медиану (Md) и межквартильный размах ($q_3; q_1$). Для построения модели прогноза вероятности развития инфекционных осложнений использовали логистическую регрессию. Для проверки статистических гипотез был использован непараметрический критерий Вилкоксона. Статистически значимыми считали показатели при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Из исследования были исключены больные с декомпенсированной соматической патологией: сердечно-сосудистой, сахарным диабетом, с неоперабельными злокачественными новообразованиями.

Результаты и обсуждение

Свободная внеклеточная ДНК в плазме. Повышенное содержание свободной ДНК в плазме крови пострадавших с тяжелой травмой относительно контроля держится на всем протяжении первых двух недель наблюдения, что обусловлено поступлением ДНК из клеток, поврежденных в результате травмы тканей. [29] Достоверно значимое повышение содержания свободной ДНК в плазме крови пострадавших с тяжелой травмой получено на 1-е [1,51 (1,22; 1,94) мкг/мл] и 3-и [1,62 (1,23; 1,83) мкг/мл, $p < 0,05$] сутки относительно группы сравнения [0,85 (1,06; 0,83) мкг/мл].

В динамике отмечено постепенное незначительное увеличение в плазме крови количества внеклеточной ДНК в течение первой недели наблюдения [1,71 (1,23; 1,92) мкг/мл, на 7-е сутки после травмы], что обусловлено, вероятнее всего, нарастанием процессов ликвидации последствий травмы с удалением продуктов клеточного распада в поврежденных тканях.

В течение второй недели наблюдения отмечено постепенное снижение данного показателя до первоначальных значений [1,56 (1,20; 1,73) мкг/мл] к 15 суткам наблюдения, что, вероятнее всего, связано с элиминацией циркулирующей в крови свободной ДНК, и нарастанием процессов репарации клеток поврежденных тканей в месте травмы.

У пострадавших с ТСТ к 15-м суткам после травмы концентрация внеклеточной ДНК в плазме крови достигала нормальных значений [0,9 (0,8; 1,4) мкг/мл, ($n=7$)].

Концентрация внеклеточной ДНК в плазме у пострадавших с ЧМТ оставалась повышенной на всем протяжении наблюдения [1-е 1,56 (1,25; 1,95) ($n=43$); 3-и 1,74 (1,44; 1,93) ($n=33$); 5-е 1,70 (1,06; 1,88) ($n=25$); 7-е 1,73 (1,46; 2,16) ($n=20$); 15-е 1,56 (1,47; 1,71) мкг/мл ($n=10$)], что скорее всего связано с закрытым локальным характером травмы и более медленным (по сравнению с ТСТ) удалением продуктов клеточного распада из травмированных тканей.

Содержание внеклеточной ДНК в плазме крови пострадавших в первые сутки после травмы не зависело от наличия или отсутствия признаков гипоксии [гипоксия «+» — 1,50 (1,24; 1,83) мкг/мл; гипоксии «-» — 1,36 (1,22; 2,03) мкг/мл], вида травмы [ТСТ — 1,50

due to the elimination of circulating levels of free DNA and the intensification processes of cell repair of damaged tissue in the site of trauma.

In patients with SCT the extracellular DNA concentration reached normal values at day 15 [0.9 (0.8, 1.4) pg/ml, ($n=7$)].

The concentration of extracellular DNA in plasma in patients with TBI remained elevated during all period of the observation [day 1: 1,56 (1,25; 1,95) ($n=43$); day 3: 1,74 (1,44; 1,93) ($n=33$); day 5: 1,70 (1,06; 1,88) ($n=25$); day 7: 1,73 (1,46; 2,16) ($n=20$); day 15: 1,56 (1,47; 1,71) pg/ml ($n=10$). Presumably, the continuous increase of extracellular DNA in circulation was due to closed nature of the local injury and slower (in comparison to SCT) removing of cellular products from damaged tissues.

Extracellular DNA concentration in plasma on first days after trauma did not depend on the presence or absence of hypoxia [hypoxia «+» — 1.50 (1.24, 1.83) pg/ml; hypoxia «-» — 1.36 (1.22, 2.03) pg/ml], type of trauma [SCT — 1.50 (1.20, 1.70), TBI — 1.56 (1.25; 1.95), SCT + TBI — 1.51 (1.22, 2.10) pg/ml], development of infectious complications [infection «+» — 1.49 (1.23, 1.90) pg/ml; infection «-» — 1.58 (1.21, 2.00) ug/ml] and outcome [survivors — 1.51 (1.25, 1.8), 8 ug/ml; dead — 1.48 (1.09, 2.02) pg/ml].

Necrotic DNA comets

There was no necrotic DNA comets in blood from healthy donors. Level of necrotic DNA comet was 3.7 (1.5, 8.8)% on day 1 post-trauma (Figure 1a). The appearance of necrotic DNA comet in circulation was associated, probably, with increased death of leukocytes by necrotic mechanism, because of active participation in the processes of phagocytosis in the area of damaged tissue [30].

Number of necrotic DNA comets on the first day after the trauma did not depend on a type of trauma [SCT — 4.65 (1.53, 5.70)%; TBI — 3.70 (1.15, 10.25)%; SCT+TBI — 3.60 (2.20, 9.80)%], amount of blood loss [I DBL — 2.85 (1.10, 9.05)%; II DBL — 4.85 (1.75, 9.75)%; III DBL — 3.55 (2.15, 7.80)%; IV DBL — 4.60 (1.60, 5.80)%], presence or absence of hypoxia signs on day 1 post-trauma [hypoxia «+» — 3.40 (2.30, 5.80)%; hypoxia «-» — 4.55 (2.33, 5.83)%], development of infectious complications [infection «+» — 3.75 (2.15, 7.80)%; infection «-» — 3.60 (0.50, 11.80)%] and outcome [survivors — 3.70 (2.30, 7.80)%; deceased patients — 3.60 (1.20, 10.40)%].

On day 3 and day 5 after the trauma more intensive necrotic death of white blood cells in hypoxia «+» group occurred [8,70 (5,10; 13,70)%, $n=17$ and 8,80 (6,18; 13,45)%, $n=16$, day 3 and day 5, respectively], was noticed in comparison with the group without hypoxia [7,40 (6,80, 10,25)%, $n=6$ and 7,20 (4,50; 7,30)%, $n=5$, day 3 and day 5, respectively], On day 7 after the trauma a decrease in the number of necrotic DNA comet [5,70 (2,55, 11,25)%] in the hypoxia «+» group and a slight increase [7,70 (4,60, 8,00)%] — in the hypoxia «-» group were observed.

Numbers of necrotic DNA comets decreased strating from day 5 [7,70 (3,53, 12,18)%] until day 15 [5,80 (2,10, 8,60)%] likely due to their elimination from the general

Injury. Blood loss

(1,20; 1,70), ЧМТ – 1,56 (1,25; 1,95), ТСТ+ЧМТ – 1,51 (1,22; 2,10) мкг/мл], развития инфекционных осложнений [инфекция «+» – 1,49 (1,23; 1,90) мкг/мл; инфекции «-» – 1,58 (1,21; 2,00) мкг/мл] и исхода [выжившие – 1,51 (1,25; 1,8) 8 мкг/мл; умершие – 1,48 (1,09; 2,02) мкг/мл] травмы.

Некротические ДНК-кометы. У здоровых доноров в крови не выявляются некротические ДНК-кометы. В первые сутки после травмы у всей группы пострадавших уровень некротических ДНК-комет белых клеток крови составил 3,7 (1,5; 8,8)% (рис. 1, а). Появление некротических ДНК-комет сопряжено, скорее всего, с повышенной гибелью лейкоцитов по некротическому механизму в результате активного их участия в процессах фагоцитоза в зоне травмированных тканей [30]. Количество некротических ДНК-комет в первые сутки после травмы не зависело от вида травмы [ТСТ – 4,65 (1,53; 5,70)%; ЧМТ – 3,70 (1,15; 10,25)%; ТСТ+ЧМТ – 3,60 (2,20; 9,80)%], объема потери крови

Рис. 1. Уровень некротических ДНК-комет у пострадавших в общей группе, в группах гипоксия «+» и гипоксия «-» (а); в группе пострадавших гипоксия «+» и инфекция «+», гипоксия «+» и инфекция «-», гипоксия «-» и инфекция «+» (б); ROC-кривая оценки прогностической ценности развития инфекционных осложнений по содержанию некротических ДНК комет на 3-и сутки после травмы в группе пострадавших гипоксия «+» (с).

Fig. 1. Level necrotic DNA comets in patients in general group, in hypoxia «+» and hypoxia «-» groups (a); hypoxia «+» and infection «+», hypoxia «+» and infection «-», hypoxia «-» and infection «+» groups (b); ROC-curve assessment of the prognostic value of infectious complications on level of necrotic DNA comets at the third day after the trauma in hypoxia «+» group (c).

Note, here and fig. 2, 4 (Примечания, здесь и на рис. 2, 4): Necrotic DNA comets – некротические ДНК-кометы; Stages of observation, days – этапы исследования, сутки; General group – общая группа; Hypoxia «+» – гипоксия «+»; Hypoxia «-» – гипоксия «-»; Infection «+» – инфекция «+»; Infection «-» – инфекция «-»; 3d day of observation – 3-и сутки наблюдения; Sensitivity – чувствительность; Specificity – специфичность. The number of patients in groups during period of observation (Число пострадавших в группах на этапах исследования): General group (общая группа): 1st day (1-е сутки) – n=87; 3d day (3-и сутки) – n=73; 5th day (5-е сутки) – n=58; 7th day (7-е сутки) – n=49; 15th day (15-е сутки) – n=29.

Нипоксия «+» (группа гипоксия «+»): 1st day (1-е сутки) – n=17; 3d day (3-и сутки) – n=17; 5th day (5-е сутки) – n=16; 7th day (7-е сутки) – n=15; 15th day (15-е сутки) – n=8.

Нипоксия «-» (группа гипоксия «-»): 1st day (1-е сутки) – n=8; 3d day (3-и сутки) – n=6; 5th day (5-е сутки) – n=5; 7th day (7-е сутки) – n=5; 15th day (15-е сутки) – n=2.

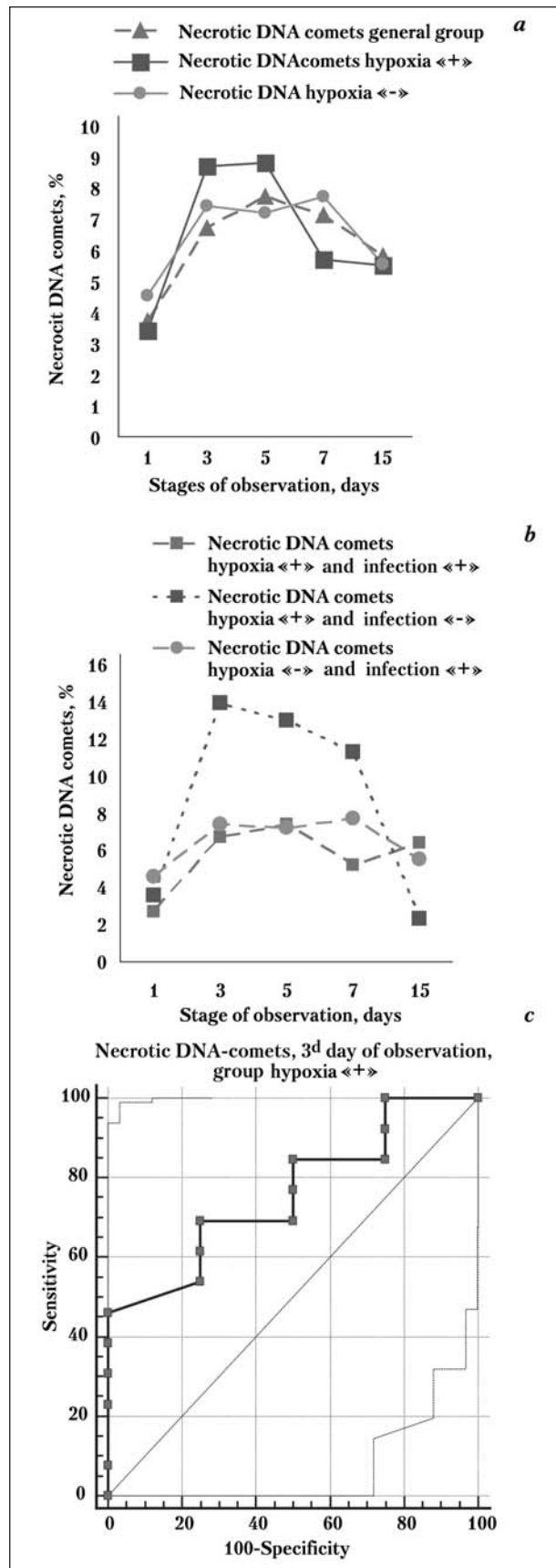
Нипоксия «+» and infection «-» (группа гипоксия «+» и инфекция «-»): 1st day (1-е сутки) – n=5; 3d day (3-и сутки) – n=4; 5th day (5-е сутки) – n=4; 7th day (7-е сутки) – n=3; 15th day (15-е сутки) – n=1.

Нипоксия «+» and infection «+» (группа гипоксия «+» и инфекция «+»): 1st day (1-е сутки) – n=13; 3d day (3-и сутки) – n=13; 5th day (5-е сутки) – n=12; 7th day (7-е сутки) – n=12; 15th day (15-е сутки) – n=7.

Нипоксия «-» and infection «+» (группа гипоксия «-» и инфекция «+»): 1st day (1-е сутки) – n=8; 3d day (3-и сутки) – n=6; 5th day (5-е сутки) – n=5; 7th day (7-е сутки) – n=5; 15th day (15-е сутки) – n=2.

bloodstream and the intensification of reparative processes in the area of trauma [30–32].

Decrease of the necrotic DNA comets by the end of the second week of observation occurred mainly in the



[КП I CT – 2,85 (1,10; 9,05)%; КП II CT – 4,85 (1,75; 9,75)%; КП III CT – 3,55 (2,15; 7,80)%; КП IV CT – 4,60 (1,60; 5,80)%], наличия или отсутствия признаков гипоксии в 1-й день после травмы [гипоксия «+» – 3,40 (2,30; 5,80)%; гипоксия «-» – 4,55 (2,33; 5,83)%], развития инфекционных осложнений [инфекция «+» – 3,75 (2,15; 7,80)%; инфекция «-» – 3,60 (0,50; 11,80)%] и исхода [выжившие – 3,70 (2,30; 7,80)%; умершие – 3,60 (1,20; 10,40)%] травмы.

Увеличение количества некротических ДНК-комет белых клеток крови на 3-и [6,70 (2,70; 12,10)%] и 5-е сутки [7,70 (3,53; 12,18)%] относительно первых [3,7 (1,5; 8,8)%], по-видимому, связано с усилением фагоцитарной активности лейкоцитов, направленной на удаление продуктов клеточного распада в поврежденных травмой тканях. Отмечено, что на 3-и и 5-е сутки после травмы более интенсивно происходит гибель белых клеток крови по некротическому механизму у пострадавших из группы гипоксия «+» [8,70 (5,10; 13,70)% ($n=17$) на 3-и и 8,80 (6,18; 13,45)% ($n=16$) на 5-е сутки], по сравнению с группой без гипоксии [7,40 (6,80; 10,25)% ($n=6$) на 3-и и 7,20 (4,50; 7,30)% ($n=5$) на 5-е сутки]. На 7-е сутки после травмы отмечено уменьшение количества некротических ДНК-комет [5,70 (2,55; 11,25)%] в группе пострадавших гипоксия «+», и незначительное увеличение [7,70 (4,60; 8,00)%] – в группе гипоксии «-».

Количество некротических ДНК-комет белых клеток крови снижается с 5-х [7,70 (3,53; 12,18)%] по 15-е [5,80 (2,10; 8,60)%] сутки наблюдения, вероятнее всего, за счет элиминации их из общего кровотока и нарастания репаративных процессов в зоне травмы [30-32]. Уменьшение количества некротических ДНК-комет к концу второй недели наблюдения происходит преимущественно в группе выживших ($n=23$) больных [5,30 (1,85; 7,85)%], а в группе умерших ($n=6$) содержание некротических ДНК-комет в этот период оставалось повышенным и составило – 8,90 (4,25; 11,23)%. Из-за малой численности выборки различия между группами не достоверны.

Достоверные изменения количества некротических ДНК-комет в динамике свидетельствуют, вероятнее всего, об активных процессах фагоцитоза в первую неделю наблюдения и нарастанием репаративных процессов в зоне травмы – во вторую неделю наблюдения.

Количество некротических ДНК-комет к 15 дню наблюдения было в 3 раза выше в группе пострадавших инфекция «+» [6,50 (2,70; 9,10)%, $n=24$], по сравнению с больными без инфекционных осложнений [2,30 (1,60; 5,80)%, $n=5$], что, вероятнее всего, обусловлено высокой гибелью белых клеток крови по некротическому механизму, связанному с их участием в разрешении инфекционных осложнений.

На рисунке 1 *b* представлены данные об уровне некротических ДНК-комет в группе гипоксия «+» в зависимости от развития инфекционных осложнений. Содержание некротических ДНК-комет в подгруппе пострадавших гипоксия «+», но нет инфекционных осложнений ($n=5$) на 3-й, 5-й и 7-й день наблюдения ко-

group of survivors ($n=23$) [5.30 (1.85, 7.85)%]. In a group with deceased patients ($n=6$) the number of necrotic DNA comets remained higher during the same period [8.90 (4.25, 11.23)%]. Differences between groups were not significant probably because of a small sample. Significant changes in the number of necrotic DNA comets might likely demonstrate the active processes of phagocytosis on the first week of observation and the intensification of reparative processes in the site of trauma later.

Numbers of necrotic DNA comet on day 15 post-trauma was three times higher in a group of patients with infection «+» (infection «+») [6,50 (2,70; 9,10)%, $n=24$], in comparison to patients without infectious complications [2,30 (1,60; 5,80)%, $n=5$], that was likely due to the higher death of white blood cells by necrotic mechanisms associated with their participation in resolution of infection.

Figure 1b shows the level of necrotic DNA comets in hypoxia «+» group depending on development of infectious complications. The level of necrotic DNA comets in the hypoxia «+» subgroup, but without infectious complications ($n=5$) on days 3, 5 and 7 post-trauma was much higher than in hypoxia «+» subgroup with infectious complications (Fig. 1b).

ROC analysis demonstrates that at a cut-off 9.8%, the sensitivity of the assay for the infection determining was 69.2% and specificity 75.0%. This value might be recommended as a threshold for the patients on day 3 after the trauma, whereas lower values increase the risk of infection increases dramatically. These data suggest that high [13.9 (10.9, 16.55)%] values of necrotic DNA comet on day 3 post-trauma might serve as a good prognostic parameter suggesting a small chance of infectious complications development despite the presence of hypoxia in patients immediately after the trauma [33]. Apparently, the active destruction of leukocytes that involved in the resolution of infection might prevent further development of infection.

Maximum values of necrotic DNA comet depended on a stage of observation and type of trauma. In patients with TBI the maximum level of necrotic DNA comet was observed on days 3 and 7 [7.10 (3.20, 11.20)% and 7.70 (4.50, 11.20)%]; in patients with SCT it reached maximum on day 5 [9.30 (5.03, 12.95)%]; in patients with a combination of TBI and SCT it was noticed on day 7 [9.80 (3.80, 11.35)%]. Lower peak of necrotic DNA comets in patients with TBI versus SCT or TBI+SCT patients might be explained, apparently, by a smaller volume of damaged tissue and isolated TBI.

Apoptotic DNA comet

Starting from the first days after trauma the number of apoptotic DNA comets was significant with an almost threefold increase in plasma [3.40 (0.88, 7.78)%] compared to the control group [1.0 (0.5, 1.1)%, $p<0.05$] (Fig. 2a).

Number of apoptotic DNA comets on day 1 after the trauma did not differ significantly in groups with and without infectious complications [infection «+» – 3.40 (0.90, 7.70)%; infection «-» – 2.90 (0.85, 8.70)%] (Fig. 2b) and did not depend on the outcome [the survivors – 3.15 (0.90, 7.70)%; deceased patients – 3.40 (0.80, 7.86)%]. In

личество некротических ДНК-комет значительно выше, чем в подгруппе гипоксия «+» и с развившимися инфекционными осложнениями (рис. 1, *b*).

С помощью построения ROC-кривых проведен анализ прогностической ценности развития инфекционных осложнений при повышенном количестве некротических ДНК-комет на 3-й, 5-й и 7-й день после травмы в группе пострадавших гипоксия «+». Значение площади под ROC кривой, построенной для 3-го дня наблюдения, составило 0,760 (рис. 1, *c*). Оптимальной величиной для оценки вероятности правильного распознавания положительных и отрицательных примеров в ROC-анализе является точка (порог) отсечения кривой (cut-off point), дающая в сумме максимальные величины чувствительности и специфичности. В нашем наблюдении точка отсечения составила 9,8%, при этом чувствительность составила 69,2%, а специфичность — 75,0%. Данную величину можно рекомендовать как пороговую для пострадавших на 3-и сутки с момента травмы, ниже которой риск развития инфекционных осложнений резко увеличивается. Эти данные свидетельствуют о том, что высокие [13,9 (10,9; 16,55)%] значения некротических ДНК-комет на 3-и сутки после травмы могут служить хорошим прогностическим признаком, позволяющим предположить малую степень вероятности развития инфекционных осложнений, несмотря на наличие гипоксии у пострадавших сразу после травмы [33]. По-видимому, активная гибель лейкоцитов, участвующих в разрешении инфекционных осложнений, и определяет предупреждение их развития у этих больных. Максимальные значения некротических ДНК-комет на этапах наблюдения отличались при различных видах травмы: при ЧМТ максимальный уровень некротических ДНК-комет приходился на 3-и и 7-е сутки наблюдения и составил, соответственно, 7,10 (3,20; 11,20)% и 7,70 (4,50; 11,20)%; при ТСТ — на 5-е сутки и составил 9,30 (5,03; 12,95)%; при ТСТ+ЧМТ — на 7-е сутки и составил 9,80 (3,80; 11,35)%. В основе более низких пиковых значений некротических ДНК-комет при ЧМТ по сравнению с ТСТ и ТСТ+ЧМТ лежат, по-видимому, меньший объем поврежденных тканей и изолированный характер ЧМТ.

Апоптотические ДНК-кометы. В первые сутки после травмы у пострадавших с травмой отмечается достоверное почти трехкратное увеличение в плазме крови количества апоптотических ДНК-комет [3,40 (0,88; 7,78)%] по сравнению с контрольной группой [1,0 (0,5; 1,1)%, $p < 0,05$] (рис. 2, *a*).

Количество апоптотических ДНК-комет в первые сутки после травмы не отличалось достоверно в группах с и без развития инфекционных осложнений [инфекция «+» — 3,40 (0,90; 7,70)%; инфекции «-» — 2,90 (0,85; 8,70)%] (рис. 2, *b*) и не зависело от исхода [выжившие — 3,15 (0,90; 7,70)%; умершие — 3,40 (0,80; 7,86)%] травмы. У пострадавших с травмой при поступлении в реаниматологическое отделение количество апоптотических ДНК-комет: при ЧМТ было выше

patients with trauma on admission to intensive care unit the number of apoptotic DNA comets varied: in patients with TBI it was higher [5.40 (0.80, 11.28)%] than in those with SCT [4.05 (2.31, 10.11)%] or SCT + TBI [2.70 (1.03, 4.10)%]. On day 1 after the trauma the relatively higher numbers of apoptotic DNA comets were revealed in patients with relatively smaller amount of damaged tissues and in isolated trauma whereas the lower numbers of apoptotic DNA comets were defined in patients with a larger amount of damaged tissues/ However, this trend might be resulted from differences in the amount of blood loss and the severity of hypoxia.

On first days after trauma the association of higher degree of blood loss and lower number of apoptotic DNA comets was noticed [I+II DBL — 4.9 (0.8, 11.2)%; I+II DBL — 2.7 (1.5, 5.6)%].

Since the amount of blood determines the severity of hypoxia on day 1 after the trauma, differences in the number of apoptotic DNA comets in patients might reflect degree of hypoxia (Fig. 2).

In a group hypoxia «+» the number of apoptotic DNA comets [2.30 (0.80, 3.80)%] was significantly lower than in hypoxia «-» group [10.80 (2.75, 12, 03)%, $p < 0,05$].

The increase in the number of apoptotic DNA comets on day 3 [4.60 (2.20, 7.90)%] after trauma was revealed in a group of all patients presumably due to intensive removing of cellular products by leukocytes in the area of trauma. The increase in apoptotic DNA comet numbers on day 7 [5.60 (2.57, 9.00)%] most likely was due to the development of infection (purulent bronchitis, pneumonia).

Simultaneous decrease in the number of leukocytes [9,2 (7,7; 12,4) $\times 10^9$] and increase the number of necrotic [6,70 (2,70; 12,10) $n=73$] and apoptotic [4,60 (2,20; 7,90) $n=73$] comets on day 3 might indirectly indicate the transition of leukocytes into the damaged tissues and their active participation in the processes of phagocytosis followed by necrotic or apoptotic cell death.

On day 15 after trauma the increase in numbers of apoptotic DNA comets was revealed, presumably because removing cellular products by white blood cells from the frontier area with damaged tissue.

Numbers of apoptotic DNA comets day 7 after the trauma in the group with infectious complications were 5.86 (2.70, 9.00)%, which were higher than those in the group without infection [3.45 (1.68, 8.09)%] (Fig. 2 *b*) and significantly differed from the control group.

On days 3 and 5 after the trauma in patients without infectious complications the level of apoptotic DNA comets was significantly higher, than in patients with infectious complications on day 3 [infection «+» — 4.36 (2.10, 7.80)%; infection «-» — 6.40 (2.90; 11,50)%, $p < 0,05$] and day 5 [infection «+» — 4.00 (1.70, 7.80)%; Infection «-» — 5,60 (2,80; 10,90)%, $p < 0,05$] post-trauma. Significant increase in apoptotic DNA comets in the infection «-» group days 3 and 5 indirectly demonstrates active participation of white blood cells in the removal of cellular products in the area of trauma at these days that may lead

[5,40 (0,80; 11,28)%], чем при ТСТ [4,05 (2,31; 10,11)%] и сочетании ТСТ+ЧМТ [2,70 (1,03; 4,10)%]. В первый день после травмы прослеживается относительно большее количество апоптотических ДНК-комет при малом и изолированном объеме травмы и их меньшее количество при большом объеме травмированных тканей, что может быть связано с объемом потери крови и выраженностью гипоксии.

В первые сутки после травмы отмечена такая закономерность: чем выше степень кровопотери, тем ниже содержание апоптотических ДНК-комет [КП I–II СТ – 4,9 (0,8; 11,2)%; КП III–IV СТ – 2,7 (1,5; 5,6)%].

Объем кровопотери определяет степень гипоксии, что в 1-е сутки после травмы проявилось различиями в содержании апоптотических ДНК-комет у пострадавших с и без гипоксии: в группе пострадавших гипоксия «+» содержание апоптотических ДНК-комет [2,30 (0,80; 3,80)%] было достоверно ниже, чем в группе больных гипоксии «-» [10,80 (2,75; 12,03)%], $p < 0,05$.

В динамике отмечается увеличение количества апоптотических ДНК-комет на 3-и сутки [4,60 (2,20; 7,90)%] после травмы во всей группе пострадавших, что, по-видимому, связано с нарастанием процессов, направленных на участие лейкоцитов в удалении продуктов клеточного распада в зоне травмы; а также увеличение их количества на 7-е [5,60 (2,57; 9,00)%] сутки – обусловленное, вероятнее всего, развитием инфекционных осложнений (гнойный трахеобронхит, пневмония).

Отмеченное на 3-й день одновременное снижение количества лейкоцитов [9,2 (7,7; 12,4) × 10⁹] и увеличение количества некротических [6,70 (2,70; 12,10) $n=73$] и апоптотических [4,60 (2,20; 7,90) $n=73$] ДНК-комет

Рис. 2. Уровень апоптотических ДНК-комет в общей группе пострадавших и в группе пострадавших гипоксия «+», гипоксии «-» (а), в группе пострадавших гипоксия «+» и инфекция «+», гипоксия «+» и инфекции «-», гипоксии «-» и инфекция «+» (б), в зависимости от развития инфекционных осложнений (с).

Fig. 2. The level of apoptotic DNA comets in the total group of patients, the hypoxia «+» and hypoxia «-» groups (а), hypoxia «+» and infection «+», hypoxia «+» and infection «-», hypoxia «-» and infection «+» groups (б), with and without infectious complications (с).

Note (Примечания):

Apoptotic DNA comets, % – апоптотические ДНК-кометы, %.

BL ml/kg (blood loss) – КП мл/кг (кровопотеря).

Stages of observation, days – этапы исследования, сутки.

Control group – контрольная группа.

* – $p < 0,05$ – достоверные различия между группой пострадавших и контрольной группой (significant differences between the patient and the control groups)

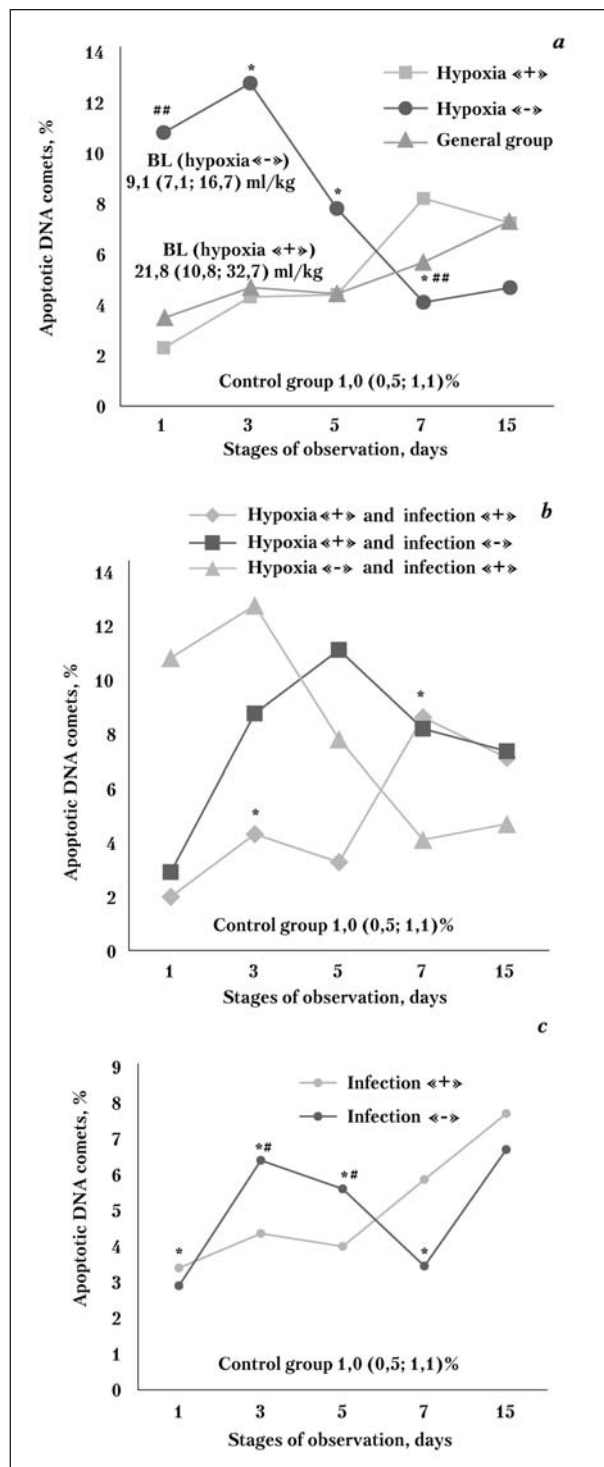
– $p < 0,05$ – достоверные различия между группой пострадавших инфекция «+» и группой пострадавших без инфекционных осложнений (significant differences between the infection «+» and without infectious complications groups)

– $p < 0,05$ – достоверные различия между группой пострадавших гипоксия «+» и гипоксия «-» (significant differences between the hypoxia «+» and hypoxia «-» groups).

to prevention of infectious complications in this group of patients.

Changes in the level of apoptotic DNA comets in hypoxia «+» and hypoxia «-» groups possessed a diverse character (Fig. 2 c): in patients with hypoxia in the first two weeks after trauma there was a gradual increase in the number of apoptotic DNA comets, while in hypoxia «-» group a decrease of apoptotic DNA comets starting from day 3 was observed.

Significant differences were obtained in apoptotic DNA comets between groups of patients with and without



белых клеток крови косвенным образом свидетельствует о переходе лейкоцитов в травмированные ткани и их активное участие в процессах фагоцитоза с последующей их гибелью по некротическому и апоптотическому механизмам.

На 15-е [7,23 (2,87; 9,30)%] сутки после травмы происходит дальнейшее увеличение количества апоптотических ДНК-комет, что может быть обусловлено участием белых клеток крови в удалении клеточного распада из приграничных с зоной травмы тканей.

Количество апоптотических ДНК-комет на 7-е сутки после травмы в группе пострадавших с инфекционными осложнениями составило 5,86 (2,70; 9,00)%, что выше, чем в группе без инфекционных осложнений [3,45 (1,68; 8,09)%] (рис. 2, *b*) и достоверно отличается от группы контроля. При этом на третьи и пятые сутки после травмы отмечена обратная зависимость. У пострадавших без инфекционных осложнений уровень апоптотических ДНК-комет достоверно выше, чем у пострадавших с инфекционными осложнениями на 3-и [инфекция «+» — 4,36 (2,10; 7,80)%; инфекции «-» — 6,40 (2,90; 11,50)%], $p < 0,05$] и 5-е [инфекция «+» — 4,00 (1,70; 7,80)%; инфекции «-» — 5,60 (2,80; 10,90)%], $p < 0,05$] сутки. Достоверное увеличение апоптотических ДНК-комет в группе пострадавших инфекции «-» на 3-и и 5-е сутки косвенным образом свидетельствует об активном участии белых клеток крови в этот период в удалении продуктов клеточного распада в зоне травмы, что, возможно, и приводит к предупреждению развития инфекционных осложнений в этой группе пострадавших.

Динамика уровня апоптотических ДНК-комет в группе гипоксия «+» и гипоксии «-» имеет разнонаправленный характер (рис. 2, *b*): у пострадавших с гипоксией в первые две недели наблюдения после травмы отмечается постепенное увеличение количества апоптотических ДНК-комет, в то время как в группе пострадавших гипоксия «-» происходит снижение значений апоптотических ДНК-комет с 3-го дня после травмы.

Получены достоверные различия по апоптотическим ДНК-кометам между группами пострадавших с и без гипоксии на 1-е [2,30 (0,80; 3,80)% — гипоксия «+», 10,8 (2,75; 12,03)%, $p < 0,05$ — гипоксии «-»] и 7-е [8,20 (5,67; 13,45)% — гипоксия «+», 4,10 (3,40; 5,10)%, $p < 0,05$ — гипоксии «-»] сутки после травмы (рис. 2, *b*).

При этом в группе пострадавших гипоксия «+» уровень лейкоцитов [1-е 15,5 (10,9; 21,1) $\times 10^9$; 3-и 8,95 (7,55; 9,40), 5-е 8,95 (6,35; 12,58); 7-е 10,2 (7,10; 13,55); 15-е 8,8 (6,95; 13,0)] на этапах исследования достоверно не отличался от группы пострадавших гипоксии «-» [1-е 15,3 (14,7; 16,1); 3-и 11,2 (6,9; 12,4); 5-е 8,2 (7,1; 8,2); 7-е 9,75 (8,2; 10,25); 15-е 9,1 (9,1; 11,2) $\times 10^9$]. Достоверные различия между группами пострадавших с и без гипоксии по содержанию апоптотических ДНК-комет обусловлены влиянием гипоксии на этот процесс и не связаны с количеством лейкоцитов в плазме крови в этих группах.

hypoxia day 1 [2.30 (0.80, 3.80)% — hypoxia «+», 10.8 (2.75, 12.03)%, $p < 0,05$ — hypoxia «-»] and day 7 [8.20 (5.67, 13.45)%, — hypoxia «+» 4.10 (3.40, 5.10)%, $p < 0,05$ — hypoxia «-»] after trauma (Fig. 2b). In the hypoxia «+» group level of leukocytes [day 1 — 15.5 (10.9, 21.1) $\times 10^9$; day 3 — 8.95 (7.55, 9.40); day 5 — 8.95 (6.35, 12.58); day 7 — 10.2 (7.10, 13.55); day 15 — 8.8 (6.95, 13.0)] did not differ significantly from the hypoxia «-» group [day 1 — 15.3 (14.7, 16.1); day 3 — 11.2 (6.9, 12.4); day 5 — 8.2 (7.1, 8.2); day 7 — 9.75 (8.2, 10.25); 15th 9.1 (9.1, 11.2) $\times 10^9$].

Significant differences between groups of patients with and without hypoxia in number of apoptotic DNA comets in blood might be due to the effect of hypoxia on the process of cell death and not related to the number of leukocytes in the blood.

Obtained data demonstrate that in the hypoxia «-» group (generally, in those with a less blood loss — BL 9.1 (7.1, 16.7) ml/kg), an active destruction of white blood cells by apoptotic mechanism occurs presumably due to participation of leukocytes in removal of cell products from damaged tissues post-trauma. Simultaneously, these processes might contribute to prevention of infectious complications.

A smaller numbers of apoptotic DNA comets [2.3 (0.8 3.8)%] on day 1 after the trauma in hypoxia «+» group were due to a significant loss of leukocytes resulting from a large volume of blood loss (BL hypoxia «+» — 21.8 (10.8, 32.7) ml/kg), and as a consequence, less active participation in the removal of cellular product from damaged tissues and insufficient participation in the prevention of infectious complications. The obtained data provide an indirect evidence on the influence of hypoxia on leukocytes functions.

On the first five days of observation an increase in white blood cells death by necrotic (Fig. 1 *a*) and apoptotic (Fig. 2 *a*) mechanisms was revealed. From the 5th to the 15th day of observation death of leukocyte by apoptotic mechanism dominated over necrosis (Fig. 1 *a* and 2 *a*).

Dynamics of the number of necrotic and apoptotic DNA comets in patients with hypoxia shows that in the first five days after trauma the processes of white blood cells death by necrotic mechanism predominate. After day 5 in the hypoxia «+» group the processes of leukocyte death by apoptotic mechanism dominated (Fig. 1 *a*, 2*b*). In patients without hypoxia on first three days after the trauma death of white blood cells occurred by both apoptotic and necrotic mechanisms.

From day 3 to day 7 post-trauma necrotic death of white blood cells dominated over apoptotic death (Fig. 1 *a*, 2 *b*).

Caspase-3, Caspase-9 and sAPO-1/Fas

In all patients with trauma the level of caspase-3 was higher than the normal values in all stages of observation and reached the highest value to the end of the second week post-trauma (Fig. 3). Dynamics of apoptotic DNA comets and the level of caspase 3 were similar. Significant differences were obtained in caspase 3 activity between the control group [1.05 (1.00, 1.32) ng/ml] and a group of patients on day 5 [2.65 (1.48, 13.75) ng/ml], $p < 0,05$,

Представленные данные свидетельствуют о том, что в группе пострадавших гипоксии «-» (как правило, с малым объемом потери крови — КП 9,1 (7,1; 16,7) мл/кг), происходит активная гибель белых клеток крови по апоптотическому механизму за счет участия лейкоцитов в процессах удаления продуктов клеточного распада из поврежденных в результате травмы тканей. Это одновременно может способствовать профилактике инфекционных осложнений.

Малое количество апоптотических ДНК-комет [2,3 (0,8; 3,8)%] в первый день после травмы в группе пострадавших гипоксия «+», по-видимому, обусловлено значительной потерей лейкоцитов в результате большого объема потери крови (КП гипоксия «+» — 21,8 (10,8; 32,7) мл/кг) и, как следствие, менее активное их участие в удалении продуктов клеточного распада из травмированных тканей и недостаточное их участие в предупреждении развития инфекционных осложнений. Полученные данные косвенным образом свидетельствуют о влиянии гипоксии на функцию лейкоцитов.

В первые 5 дней наблюдения за пострадавшими от травмы отмечено увеличение гибели белых клеток крови как по некротическому (рис. 1, а), так и по апоптотическому (рис. 2, а) механизмам. С 5-го по 15-й день наблюдения гибель лейкоцитов по апоптотическому механизму преобладает над некротическим (рис. 1, а и рис. 2, а).

При гипоксии динамика количества некротических и апоптотических ДНК-комет у пострадавших от травмы свидетельствует о том, что в первые 5 дней после травмы преобладают процессы гибели белых клеток крови по некротическому механизму. После 5-го дня наблюдения у пострадавших после травмы в группе гипоксия «+» наоборот преобладают процессы гибели лейкоцитов по апоптотическому механизму (рис. 1, а и рис. 2, б).

При отсутствии же гипоксии в первые 3 дня после травмы гибель белых клеток крови происходит по апоптотическому и некротическому механизму одновременно. С 3-го по 7-й день наблюдения процессы некротической гибели белых клеток крови преобладают над апоптотическими (рис. 1, а и рис. 2, б).

Каспаза-3, каспаза-9 и sAPO-1/Fas. У всех пострадавших с травмой уровень каспазы-3 был выше нормальных значений на всех этапах наблюдения и к концу второй недели наблюдения достигал наибольшего значения (рис. 3). Динамика содержания апоптотических ДНК-комет и уровня каспазы 3 имеет сходный характер изменения кривой. Получены достоверные различия по активности каспазы 3 между группой контроля [1,05 (1,00; 1,32) нг/мл] и группой пострадавших на 5-е [2,65 (1,48; 13,75) нг/мл, $p < 0,05$, $n = 64$], 7-е [9,30 (2,15; 27,25) нг/мл, $p < 0,05$, $n = 55$] и 15-е сутки [9,90 (2,05; 46,90) нг/мл, $p < 0,05$, $n = 35$].

Получены достоверные различия в уровне каспазы-9 между группой контроля [1,9 (0,73; 3,89) нг/мл] и группой пострадавших на 5-е [5,06 (2,15; 7,65) нг/мл, $p < 0,05$, $n = 66$] и 7-е сутки [5,07 (2,12; 10,90) нг/мл, $p < 0,05$, $n = 58$] (рис. 3).

$n = 64$], day 7 [9.30 (2.15, 27.25) ng/ml, $p < 0,05$, $n = 55$], and day 15 [9.90 (2.05, 46.90) ng/ml, $p < 0,05$, $n = 35$].

Significant differences were obtained in the level of caspase-9 between the control group [1.9 (0.73, 3.89) ng/ml] and a group of patients on day 5 [5.06 (2.15, 7.65) ng/ml, $p < 0,05$, $n = 66$] and day 7 [5.07 (2.12, 10.90) ng/ml, $p < 0,05$, $n = 58$] (Fig. 3).

Interestingly, on day 1 after the trauma the concentration of sAPO-1/Fas (CD-95) increased significantly.

Significant differences in the level sAPO-1/Fas were obtained when compared control group [64.69 (83.05, 46.33) pg/ml] and patients on day 1 [410.6 (260.7, 629.2) pg/ml, $p < 0,05$, $n = 22$] or day 3 [388.0 (33.4, 808.5) pg/ml, $p < 0,05$, $n = 20$], or day 5 [566.5 (377.3, 838.3) pg/ml, $p < 0,05$, $n = 14$] or day 7 [396.3 (22.63, 907.0) pg/ml, $n = 14$, $p < 0,05$] (Fig. 3); as well as groups of survivors [274.4 (241.4, 464.5) pg/ml, $n = 13$] versus patients who died [625.0 (429.8, 734.0) pg/ml, $n = 9$, $p < 0,05$] (in a latter case, the comparison was performed on day 1).

These data suggest that immediately after the trauma the intensification of the process of apoptosis by activation of effector caspase 3 through the CD-95 (sAPO-1/Fas) was triggered. On days 5 and 7 after the trauma the

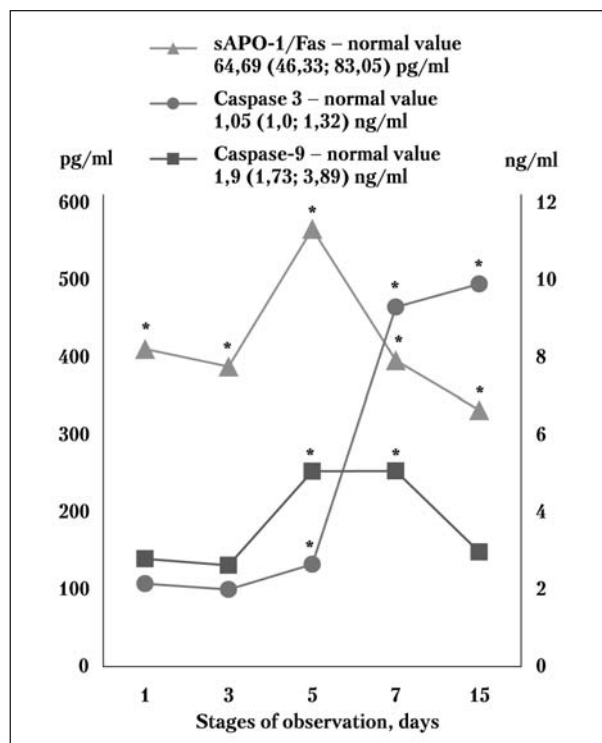


Рис. 3 Уровень каспазы-3, каспазы-9 и содержание sAPO-1/Fas в общей группе пострадавших.

Fig. 3 Level of caspase-3, caspase-9 and sAPO-1/Fas in the total group of patients.

Note (Примечания): Normal value — нормальные значения; Stages of observation, days — этапы исследования, сутки; Caspase — каспаза; sAPO-1/Fas — soluble APO-1/Fas (растворимый Fas рецептор); pg/ml — пкг/мл; ng/ml — нг/мл.

* — $p < 0,05$ — significant differences between the patients and the control group (достоверные различия между группой пострадавших и группой контроля).

Injury. Blood loss

Наряду с этим в первый день после травмы отмечено достоверное повышение содержания sAPO-1/Fas (CD-95).

Получены достоверные различия в уровне sAPO-1/Fas между группой контроля [64,69 (83,05; 46,33) пкг/мл] и группой пострадавших на 1-е [410,6 (260,7; 629,2) пкг/мл, $p < 0,05$, $n = 22$], 3-и [388,0 (33,4; 808,5) пкг/мл, $p < 0,05$, $n = 20$], 5-е [566,5 (377,3; 838,3) пкг/мл, $p < 0,05$, $n = 14$] и 7-е сутки [396,3 (22,63; 907,0) пкг/мл, $n = 14$, $p < 0,05$] (рис. 3); а также между группой выживших [274,4 (241,4; 464,5) пкг/мл, $n = 13$] и умерших больных [625,0 (429,8; 734,0) пкг/мл, $n = 9$, $p < 0,05$] на 1-е сутки.

Представленные данные свидетельствуют о том, что сразу после травмы запускается интенсификация процесса апоптоза за счет активации эффекторной каспазы 3 через CD-95 (sAPO-1/Fas). На 5-е и 7-е сутки после травмы в активацию процесса апоптоза белых клеток крови вовлекается каспаза-9 (рис. 3).

Одно-, двунитевые разрывы в молекуле ДНК. С помощью щелочного электрофореза были оценены одно-, двунитевые разрывы (интегральный показатель) в молекуле ДНК белых клеток крови, происходящие, как правило, с участием эндонуклеаз.

Из рисунка 4, а видно, что в группе пострадавших с травмой на всех этапах исследования имеет место достоверное повышение значения интегрального показателя относительно группы сравнения. Увеличение интегрального показателя в первые две недели наблюдения соизмеримо с повышением количества апоптотических ДНК-комет и появлением некротических ДНК-комет белых клеток крови в этот период (рис. 4, а).

Повышенное значение интегрального показателя у пострадавших с травмой может отражать увеличение гидролиза ДНК по механизму одно-, двунитевых разрывов погибающих по апоптотическому и некротическому механизмам белых клеток крови.

Рис. 4. Интегральный (одно-, двунитевые разрывы в молекуле ДНК) показатель у пострадавших с травмой (а). ROC-кривая оценки прогностической ценности отсутствия развития инфекционных осложнений по уровню интегрального показателя разрывов ДНК на 3-и сутки после травмы в группе пострадавших гипоксия «+» (б)

Fig. 4. Integral index (single and double breaks in the DNA molecule) in patients with trauma (a). ROC-curve of assess the prognostic value of absence of infectious complications at the level of the integral index of DNA breaks on the third day after the trauma in patients in group hypoxia «+» (b).

Note (Примечание):

Stages of observation, days — этапы исследования, сутки; General group — общая группа; Control group — Группа сравнения, single and double breaks in the DNA — одно-, двунитевые разрывы ДНК. Integral index of DNA breaks on the third day after the trauma in patients in group hypoxia «+» — интегральный показатель разрывов ДНК на 3-и сутки в группе пострадавших гипоксия «+»; Sensitivity — чувствительность, Specificity — специфичность.

* — $p < 0,05$ — significant differences between the patients and the control group (достоверные различия между группой пострадавших и группой контроля).

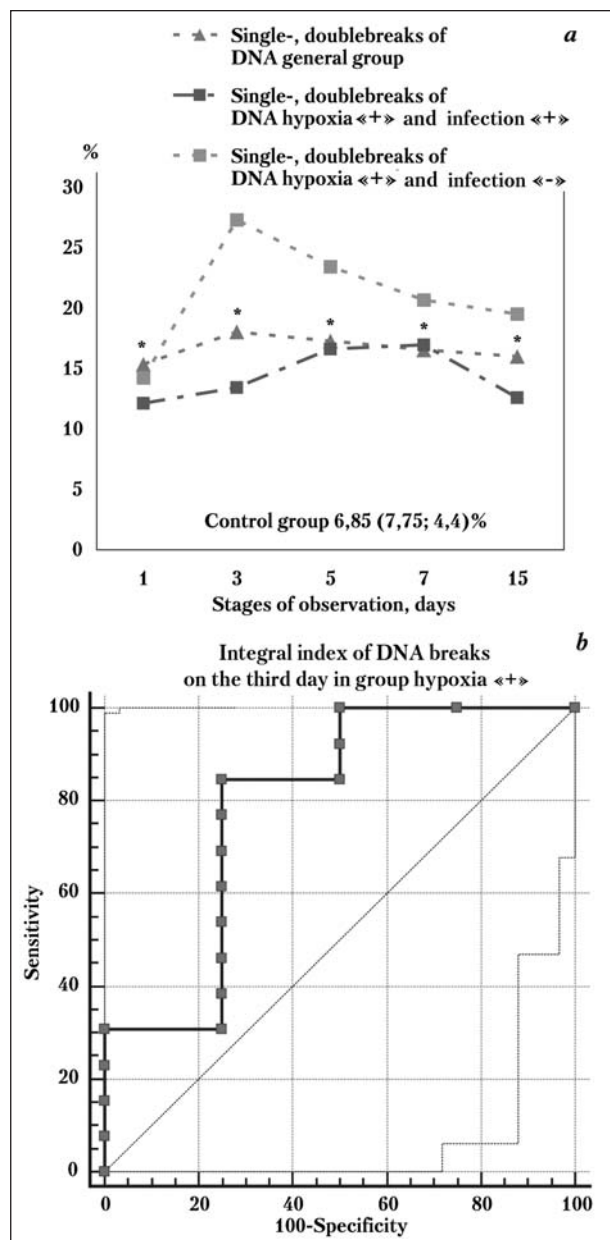
involvement of caspase-9 in activation of the apoptotic process of white blood cells became evident (Fig. 3).

Single-, double-strand breaks in the DNA molecule

Single-, double-strand breaks (integral parameter) in the DNA molecule of white blood cells were evaluated simultaneously by using alkali electrophoresis. These brakes usually depend on activities of endonucleases.

Figure 4 a shows that in the group of patients with trauma in all stages of the research the integral index holds significant increase in comparison to the control group.

Increase in the integral index in the first two weeks of observation was comparable with the increase in number of apoptotic DNA comets and appearance of necrotic DNA comet during this period (Fig. 4 a). Increase in the integral index in patients with trauma might reflect an increase of hydrolysis in DNA by single, double-strand breaks and apoptotic and necrotic mechanisms of white blood cells death.



Максимальное значение одно-, двуниевых разрывов в молекуле ДНК отмечено на 3-и сутки после травмы [18,04 (13,52; 22,20)%]. С 3-х по 15-е сутки наблюдения происходит постепенное снижение интегрального показателя практически до первоначального значения [16,02 (12,54; 18,95)% на 15-сутки].

У пострадавших в группе гипоксия «+» количество одно-, двуниевых разрывов ДНК в первый день после травмы составило 12,90 (11,53; 16,40)%, и было достоверно меньше, чем в группе гипоксия «-» [18,35 (12,78; 19,77)%, $p < 0,05$].

В группе пострадавших гипоксия «+» + инфекция «+» показатель количества одно-, двуниевых разрывов ДНК на протяжении всего периода наблюдения остается ниже показателя значений одно-, двуниевых разрывов ДНК в группе пострадавших гипоксия «+» и инфекция «-» (рис. 4, а).

Выявлено значительное увеличение интегрального показателя на третий день после травмы в группе гипоксия «+» и инфекция «-» [27,3 (21,4; 32,5)%] относительно группы контроля [6,85 (7,75; 4,4)%] и гипоксия «+» и инфекция «+» [13,44 (10,28; 18,64)%].

С помощью построения ROC-кривых проведен анализ прогностической ценности развития инфекционных осложнений при повышенном интегральном показателе на 3-й, 5-й и 7-й день после травмы в группе пострадавших гипоксия «+». Значение площади под ROC кривой, построенной для 3-го дня наблюдения, составило 0,788 (рис. 4, б). Эти данные свидетельствуют о том, что высокие [27,3 (21,4; 32,5)%] значения одно-, двуниевых разрывов ДНК на 3-и сутки после травмы могут служить хорошим прогностическим признаком, позволяющим предположить малую степень вероятности развития инфекционных осложнений несмотря на наличие гипоксии у пострадавших сразу после травмы. В нашем наблюдении точка отсечения составила 18,6%, при этом чувствительность составила 83,3%, а специфичность — 75,0%. Данную величину можно рекомендовать как пороговую для пострадавших на 3-и сутки с момента травмы, ниже которой риск развития инфекционных осложнений резко увеличивается. По-видимому, активная гибель лейкоцитов по некротическому механизму сопровождающемуся одно-, двуниевыми разрывами определяет предупреждение развития гнойно-септических осложнений у этих больных. Значения интегрального показателя в первый день после травмы не зависели от исхода [выжившие — 14,69 (12,67; 19,89)%, умершие — 17,0 (11,72; 22,2)%] травмы и объема потери крови [КП I и II СТ — 17,0 (12,8; 20,3)%, КП III и IV СТ — 14,2 (12,22; 21,0)%]. Полученные данные свидетельствуют о влиянии гипоксии на гидролиз ДНК белых клеток крови по механизму одно-, двуниевых разрывов.

Двуниевые разрывы в молекулах ДНК белых клеток крови. Значения показателя двуниевых разрывов ДНК в первый день после травмы были в пределах нормы [5,44 (3,39; 8,77)%], не зависели от вида [ТСТ — 4,44 (3,35; 6,48)%, ЧМТ — 5,97 (3,70; 8,97)%],

The maximum value of a single, double-strand breaks in the DNA molecule were observed on the third day after trauma [18.04 (13.52, 22.20)%]. From day 3 to day 15 of observation the values of integral index gradually decreased to its initial value [16.02 (12.54, 18.95)% on day 15].

The number of single, double-stranded DNA breaks in the first day after the trauma was 12.90 (11.53, 16.40)% in patients in group hypoxia «+» that was significantly less than in the hypoxia «-» group [18, 35 (12,78; 19,77)%, $p < 0,05$].

The numbers of single, double strand DNA breaks during the observation period were lower in a group hypoxia «+» + infection «+» than in the group hypoxia «+» + infection «-» (Fig. 4 a).

There was a significant increase in integral index day 3 after the trauma in the hypoxia «+» + infection «-» group [27.3 (21.4, 32.5)%] in comparison to the control group [6.85 (7.75, 4, 4)%] and hypoxia «+» + infection «+» group [13.44 (10.28, 18.64)%].

The prognostic value of the infectious complications development was assessed by ROC analysis of elevated integral indexes on days 3, 5 and 7 after trauma in patients from a group hypoxia «+». Area under the curve (AUC) for the data obtained on day 3 post-trauma was 0.788 (Fig. 4 b).

These data suggest that high values of single, double strand breaks [27.3 (21.4, 32.5)%] as determined on day 3 after the trauma might serve as a potential prognostic sign that suggests a low degree of infection development despite the presence of hypoxia in patients immediately after the trauma. In our observation, at an optimal cut-off point of 18.6%, the sensitivity was 83.3% and specificity was 75.0%. This value (18.6%) might be recommended as a threshold for the patients on the third day after trauma; lowering this value might mean the dramatical increase of risk of infection. Apparently, the active destruction of leukocytes by necrotic mechanisms that is accompanied by single, double strand breaks prevent the development of infectious complications in these patients. Integral index values on the first day after the trauma did not depend on the outcome of trauma [the survivors — 14.69 (12.67, 19.89)%, deceased patients — 17.0 (11.72, 22.2)%] and amount of blood loss [I+II DBL — 17.0 (12.8, 20.3)%, III+IV DBL — 14.2 (12.22, 21.0)%]. The obtained data link the effect of hypoxia on DNA hydrolysis of white blood cells and single-, double-strand breaks of DNA as a mechanism of cell death.

Double-strand breaks of DNA molecules in white blood cells

The values of DNA double strand breaks in the first day after trauma were within normal limits [5.44 (3.39, 8.77)%], not depending on (a) type of trauma [SCT — 4.44 (3.35, 6.48)%, TBI — 5.97 (3.70, 8.97)%, SCT+TBI — 4.96 (3.48, 8.39)%], (b) amount of blood loss [I+II DBL — 5.5 (3.6, 8.9)%, III+IV DBL — 5.1 (3.1, 8.4)%] and (c) development of infectious complications [infection «+» — 4.84 (3.24, 8.94)%; infection «-» — 5.50 (4.20, 7.64)%].

In the dynamics the increases in double-stranded DNA breaks of white blood cells on day 3 [7.11 (3.50,

Injury. Blood loss

ТСТ+ЧМТ – 4,96 (3,48; 8,39)% травмы, объема потери крови [КП I и II СТ – 5,5 (3,6; 8,9)%, КП III и IV СТ – 5,1 (3,1; 8,4)%] и развития инфекционных осложнений [инфекция «+» – 4,84 (3,24; 8,94)%, инфекция «-» – 5,50 (4,20; 7,64)%].

В динамике отмечено увеличение выше нормы показателя двунитевых разрывов ДНК белых клеток крови на 3-и [7,11 (3,50; 9,43)%], 5-е [6,5 (3,74; 10,01)%] и 15 [7,11 (5,79; 9,01)%] сутки наблюдения (рис. 5).

Динамика изменения показателя двунитевых разрывов ДНК (рис. 5, *b*) в группе пострадавших гипоксия «-» в первую неделю после травмы напоминает изменения показателя апоптотических ДНК комет (рис. 2, *c*) в той же группе. Можно предположить, что повышенная гибель белых клеток крови за счет апоптоза у пострадавших с травмой без гипоксии идет с гидролизом ДНК по механизму двунитевых разрывов. У пострадавших из группы гипоксия «+» при поступлении в реаниматологическое отделение показатель двунитевых разрывов ДНК был в пределах нормальных значений [4,60 (2,29; 7,90)%, $p < 0,05$] и был достоверно ниже, чем в группе пострадавших гипоксии «-» [8,18 (3,40; 11,41)%]. На 3-и сутки уровень двунитевых разрывов ДНК увеличивается в обеих группах, но остается выше в группе гипоксии «-» (рис. 5).

В группе выживших пострадавших количество двунитевых разрывов ДНК в первый день после травмы находилось в пределах нормальных значений [4,90 (3,37; 8,01)%] и было достоверно ниже, чем в группе умерших [6,12 (3,70; 9,02)%, $p < 0,05$] больных, в которой значения показателя двунитевых разрывов ДНК были выше нормы на всех этапах наблюдения.

В группе пострадавших инфекции «-» на 5-й день после травмы отмечено одновременное увеличение количества некротических ДНК-комет и показателя двунитевых разрывов ДНК. Полученные данные косвенным образом свидетельствуют о том, что в этой группе пострадавших на 5-е сутки идет повышенная гибель лейкоцитов по некротическому механизму, в том числе и с двунитевыми разрывами.

Корреляционные зависимости. Концентрация внеклеточной ДНК в плазме пострадавших с тяжелой сочетанной травмой (ТСТ) в первый день после травмы имела слабую степень положительной корреляции с некротическими ДНК-кометами ($r=0,407$) и двунитевыми разрывами в молекуле ДНК ($r=0,399$). В свою очередь, некротические ДНК-кометы имели среднюю степень ($r=0,560$) положительной корреляции с двунитевыми разрывами в молекуле ДНК (табл. 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что повышение количества внеклеточной ДНК сразу после травмы при ТСТ обусловлено не только попаданием ДНК из клеток травмированных тканей, но и отчасти вкладом ДНК белых клеток крови, разрушаемых по механизму некроза. При этом распад ДНК клеток травмированных тканей и белых клеток крови при ТСТ идет преимущественно по механизму двунитевых разрывов. Наряду с этим в первые сутки после травмы отмечена

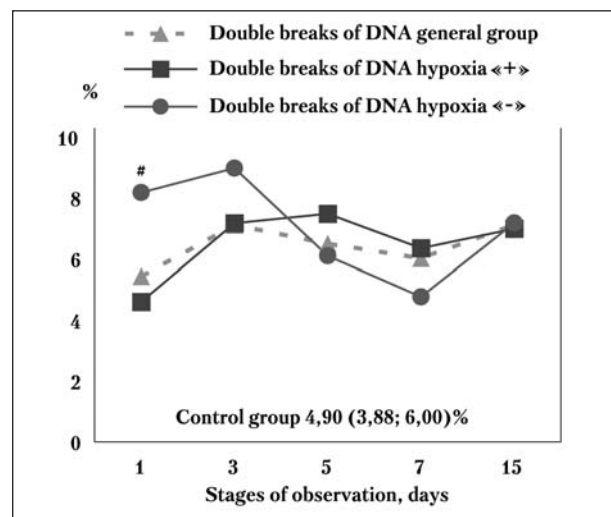


Рис. 5. Двунитевые разрывы ДНК у пострадавших в общей группе и в группах гипоксия «+» и гипоксии «-».

Fig. 5. DNA double strand breaks in patients in the total group and groups hypoxia «+» and hypoxia «-».

Note (Примечание): double strand breaks of DNA – двунитевые разрывы ДНК; stages of observation, days – этапы исследования, сутки; general group – общая группа; hypoxia «+» – гипоксия «+»; hypoxia «-» – гипоксия «-»; control group – контрольная группа.

– $p < 0,05$ – significant differences between hypoxia «+» and hypoxia «-» groups (достоверные различия между группами гипоксия «+» и гипоксии «-»).

9.43)%, day 5 [6.5 (3.74, 10.01)%] and day 15 [7.11 (5.79, 9.01)%] were observed (Fig. 5).

Dynamics of changes in DNA double-strand breaks (Fig. 5 *b*) in the hypoxia «-» group during the first week after trauma reminds changes in apoptotic DNA comets numbers (Fig. 2 *c*) in the same group. It can be assumed that the increase of white blood cell death by apoptosis in patients with trauma without hypoxia occurs by hydrolysis of DNA via the double-strand DNA breaks mechanism.

In hypoxia «+» group at admissions the DNA double strand breaks were within the normal range [4,60 (2,29; 7,90)%, $p < 0,05$] and were significantly lower than in the hypoxia «-» group [8.18 (3.40, 11.41)%]. On day 3 post trauma, the increase in the level of DNA double strand breaks in both groups was observed, however, it remained higher in the hypoxia «-» group (Fig. 5).

In survivors group, the amount of double-stranded DNA breaks in the first day after the trauma was within the normal range [4.90 (3.37, 8.01)%] being significantly lower than in the group of deceased patients [6.12 (3.70 ; 9.02)%, $p < 0,05$]. In the group of patients, who died, the DNA double strand breaks were lower than normal values during the whole period of observation.

In the group of patients with no infection (infection «-» group) on day 5 after the trauma a simultaneous increases in the numbers of necrotic DNA comets and DNA double strand breaks were observed. These data indirectly indicate that in this group of patients increases in leukocyte death on day 5 occur by necrotic mechanism through double-stranded breaks.

слабая степень ($r=0,390$) положительной корреляции между процентным содержанием некротических и апоптотических ДНК-комет в плазме крови пострадавших, что свидетельствует об одновременном апоптотическом и некротическом путях гибели белых клеток крови в этот период.

Повышение количества внеклеточной ДНК в плазме крови пострадавших с ТСТ на 5-е сутки после травмы имело среднюю степень корреляционной зависимости с некротическими ДНК-кометами ($r=0,572$) и слабую степень положительной корреляции с апоптотическими ДНК-кометами ($r=0,336$). Это свидетельствует об одновременном апоптотическом и некротическом механизмах гибели белых клеток крови на 5-й день после травмы и их значительном вкладе в повышение уровня внеклеточной ДНК в плазме при ТСТ. При этом отмечена высокая степень корреляции ($r=0,650$) между апоптотическими ДНК-кометами и интегральным (одно-, двунитевые разрывы ДНК) показателем и средняя степень корреляции ($r=0,462$) между апоптотическими ДНК-кометами и двунитевыми разрывами, что может свидетельствовать о том, что гидролиз ДНК белых клеток крови при ТСТ на 5-е сутки после травмы идет по механизму одно- и двунитевых разрывов.

В отличие от пострадавших с тяжелой сочетанной травмой у больных с ЧМТ в первую неделю после травмы не отмечено корреляционных зависимостей по внеклеточной ДНК, что может быть связано с малым объемом травмированных тканей и локальным закрытым видом черепно-мозговой травмы.

В конце второй недели наблюдения у пострадавших с ЧМТ выявлена средняя положительная степень корреляции ($r=0,551$) между процентным содержанием апоптотических ДНК-комет и интегральным (одно-, двунитевые разрывы) показателем, а также высокая положительная степень корреляции ($r=0,70$) между внеклеточной ДНК и интегральным показателем. Представленные данные свидетельствуют о том, что образование внеклеточной ДНК и апоптотических ДНК-комет белых клеток крови на 15 день наблюдения сопряжено с одно- и двунитевыми разрывами. При этом ДНК белых клеток крови, погибших по апоптотическому механизму, дает определенный вклад в количество внеклеточной ДНК в плазме пострадавших в этот период.

На 15-е сутки после травмы у пострадавших с ЧМТ отмечена высокая отрицательная корреляционная связь между внеклеточной ДНК и некротическими ДНК-кометами ($r=-0,60$), а также между внеклеточной ДНК и двунитевыми разрывами ($r=-0,60$). При этом процент некротических ДНК-комет имел высокую положительную степень корреляции ($r=0,709$) с двунитевыми разрывами. Полученные данные свидетельствуют о том, что повышенное содержание внеклеточной ДНК в плазме крови пострадавших с ЧМТ на 15 сутки обусловлено вкладом ДНК белых клеток крови, погибших по апоптотичес-

On day 3 after trauma and severe hypoxia without infectious complications, levels of necrotic DNA comets, apoptotic DNA comets and single, double strand DNA breaks were higher than the same values in the group of patients with infection and hemorrhage and/or severe hypoxia. The values of all three parameters were united and ROC analysis was performed to identify the significance of the total (necrotic DNA comet + apoptotic DNA comet + single DNA breaks) index as a prognostic marker of a probability of infectious complication. ROC analysis of data received on day 3 after the trauma in the hypoxia «+» group showed in Fig. 6 *a,b*.

1. The area under the ROC curve for the total amount at the 3rd day after the trauma, was 0.923 (sensitivity of 100%, specificity – 75,0%). The cut-off point (cut-off point) was 47,3%

2. The level of the overall score is higher than a given point can serve as a good prognostic sign, which suggests that a small degree of probability of infectious complications.

3. The total value of the index is lower 47,3% indicates a high risk of infectious complications in patients with trauma and severe hypoxia.

Correlations

Concentration of extracellular DNA in plasma patients with severe concomitant trauma (SCT) on the first day after the trauma slightly correlated positively with necrotic DNA comets ($r=0,407$) and double-strand breaks in DNA ($r=0,399$). Numbers of necrotic DNA comets correlated strongly ($r=0,560$) with a number of double stranded DNA breaks (Table 2).

The obtained data indicate that increased amounts of extracellular DNA after SCT resulted not only from cells of damaged tissue, but also (at least, in part) because to liberation of DNA from white blood cells destroyed by necrosis. In this regard the disintegration of DNA is mainly due to generation of double-strand breaks. On day 1 after trauma a mild degree ($r=0,390$) of positive correlation between the percentage of necrotic and apoptotic DNA comets in patients plasma was revealed indicating simultaneous induction of both apoptotic and necrotic cell death pathways in white blood cells during this period.

Increased amount of extracellular DNA in blood plasma of patients with SCT on day 5 after the trauma correlated with the amount of necrotic DNA comets ($r=0,572$) whereas a weaker positive correlation with apoptotic DNA comets was revealed ($r=0,336$).

This indicates the simultaneous induction of apoptotic and necrotic death mechanisms in white blood cells on day 5 after the trauma and their significant contribution to the increase of extracellular DNA in plasma in SCT patients. At the same time, there was a high-degree, correlation ($r=0,650$) between apoptotic DNA comets and integral index (single, double-stranded DNA breaks), and a correlation of average degree ($r=0,462$) between apoptotic DNA comets and double-strand breaks. These data suggest that the hydrolysis of the DNA in the SCT on day 5 after the trauma occurs by the mechanism of single-and double-strand breaks.

Injury. Blood loss

Таблица 2. Корреляционные зависимости между показателями ДНК-повреждений у пострадавших с травмой
Table 2. Correlations between different estimations of a DNA damage in patients with trauma

Indicators	DNA in plasma	Double-strand breaks in DNA	Single-, double-strand breaks in DNA	Apoptotic DNA-comets	Necrotic DNA-comets
SCT					
DNA in plasma		$r=0.399$ (1 st day)		$r=0.336$ (5 th day)	$r=0.407$ (1 st day) $r=0.573$ (5 th day)
Necrotic DNA-comets	$r=0.407$ (1 st day) $r=0.573$ (5 th day)	$r=0.56$ (1 st day)		$r=0.39$ (1 st day)	
Apoptotic DNA-comets	$r=0.336$ (5 th day)	$r=0.462$ (5 th day)	$r=0.650$ (5 th day)		$r=0.39$ (1 st day)
TBI					
DNA in plasma		$r=-0.60$ (15 th day)	$r=0.70$ (15 th day)		$r=-0.60$ (15 th day)
Apoptotic DNA-comets			$r=0.551$ (15 th day)		
Necrotic DNA-comets		$r=0.709$ (15 th day)			
TBI+SCT					
DNA in plasma		$r=0.307$ (7 th day)	$r=0.318$ (7 th day) $r=0.587$ (15 th day)	$r=0.419$ (15 th day)	$r=0.359$ (15 th day)
Apoptotic DNA-comets		$r=0.532$ (7 th day) $r=0.582$ (15 th day)	$r=0.526$ (3 ^d day)		$r=0.392$ (15 th day)
Necrotic DNA-comets		$r=0.735$ (15 th day)		$r=0.392$ (15 th day)	
Single-. double-strand breaks in DNA		$r=0.659$ (3 ^d day) $r=0.611$ (7 th day)			

Note (примечание): Indicators – показатели; SCT – severe concomitant trauma (тяжелая скелетная травма); TBI – traumatic brain injury (черепно-мозговая травма); DNA in plasma – ДНК в плазме; Apoptotic DNA-comets – апоптотические ДНК-кометы; Necrotic DNA-comets – некротические ДНК-кометы; Single-. double-strand breaks in DNA – одно-, двуниевые разрывы ДНК; Double-strand breaks in DNA – двуниевые разрывы ДНК; day – сутки.

$p < 0,05$ – различия между группами по коэффициенту корреляции Спирмана; $p < 0,05$ – difference between groups by Spearman rank correlation coefficient.

кому, а не по некротическому механизму. В этот период у пострадавших с ЧМТ образование некротических ДНК-комет белых клеток крови осуществляется по механизму двуниевых разрывов.

У пострадавших с ТСТ+ЧМТ корреляционные зависимости между исследуемыми показателями повреждений ДНК выявлены на 3-и, 7-е и 15-е сутки. На 3-и сутки после травмы выявлена средняя степень корреляционной зависимости ($r=0,526$) между апоптотическими ДНК-кометами и одно-, двуниевыми разрывами, а также между двуниевыми и одно-, двуниевыми разрывами ($r=0,659$).

На 7-е сутки после травмы отмечена слабая корреляционная зависимость показателей свободной ДНК в плазме и двуниевыми разрывами ($r=0,307$), а также между свободной ДНК в плазме и одно-, двуниевыми разрывами ($r=0,318$). В этот же период отмечена средняя степень корреляционной зависимости ($r=0,532$) между

In contrast to patients with severe concomitant trauma, in patients with TBI during the first week after trauma any correlations between extracellular DNA and DNA comets were not observed that might be with a result of a small volume of damaged tissues and local and closed character of brain trauma.

At the end of the second week of observation, in patients with TBI an average positive correlation ($r=0,551$) between the percentage of apoptotic DNA comets and integral (single, double-strand breaks) index, and a strong positive correlation ($r=0,70$) between extracellular DNA and integral index, were observed. These data suggest that both production of extracellular DNA and apoptotic DNA comets in white blood cells were associated with single and double strand breaks on day 15. This means that

DNA of white blood cells that dyed by apoptotic mechanism contributes to the amount of extracellular DNA in circulation within indicated period.

апоптотическими ДНК-кометами и двунитевыми разрывами.

При сочетании ТСТ и ЧМТ гибель белых клеток крови в первую неделю после травмы происходит по апоптотическому механизму. А повреждение ДНК при этом идет в первые 3-е суток по механизму одно-, двунитевых разрывов, а в дальнейшем преимущественно по механизму двунитевых разрывов.

У пострадавших с сочетанной ЧМТ+ТСТ на 15-е сутки наблюдения повышенный уровень внеклеточной ДНК имел слабую степень положительной корреляции с некротическими ($r=0,359$) и апоптотическими ($r=0,419$) ДНК-кометами и среднюю положительную степень корреляции ($r=0,587$) с интегральным (одно-, двунитевые разрывы) показателем. Наряду с этим отмечена высокая положительная степень корреляции двунитевых разрывов с некротическими ($r=0,735$) и средняя корреляционная зависимость с апоптотическими ($r=0,582$) ДНК-кометами. Полученные данные свидетельствуют о том, что повышенное содержание внеклеточной ДНК обусловлено на 15-е сутки как за счет попадания ДНК из клеток травмированных тканей, так и за счет значительного вклада ДНК белых клеток крови, разрушаемых по некротическому и апоптотическому механизмам. Гидролиз ДНК белых клеток крови происходит по механизму одно- и двунитевых разрывов одновременно. При этом ДНК белых клеток крови дают значительный вклад в высокий уровень внеклеточной ДНК при ЧМТ+ТСТ на 15-е сутки наблюдения. Образование некротических и апоптотических ДНК-комет белых клеток крови сопряжено с двунитевыми разрывами.

8-гидрокси-2-дезоксигуанозин и супероксиддисмутаза (СОД) в плазме крови пострадавших. Уровень 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина у пострадавших после травмы в 1-е [1,3 (0,8; 2,2) пкг/мл, $p<0,05$], 3-и [1,3 (0,71; 2,2) пкг/мл, $p<0,05$], 5-е [1,5 (0,77; 2,35) пкг/мл, $p<0,05$] и 7-е [1,6 (0,7; 2,3) пкг/мл, $p<0,05$] сутки наблюдения был достоверно ниже значений группы сравнения [3,6 (4,4; 3,2) пкг/мл] (рис. 6). В динамике в первые две недели наблюдения отмечается постепенное незначительное увеличение данного показателя, который к 15-м суткам наблюдения все равно остается ниже нормальных значений почти в два [1,5 (0,56; 2,90) пкг/мл] раза (рис. 6).

В общей группе пострадавших получено достоверное относительно контроля повышение уровня супероксиддисмутазы на всем протяжении наблюдения (рис. 6).

Количество 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в плазме крови пострадавших в первые сутки после травмы не зависело от объема потери крови [КП I СТ — 1,65 (1,28; 2,58) пкг/мл; КП II СТ — 1,08 (0,59; 1,46) пкг/мл; КП III СТ — 1,30 (0,85; 3,13) пкг/мл; КП IV СТ — 1,10 (0,71; 1,98) пкг/мл], гипоксии [гипоксия «+» — 1,45 (0,73; 2,43) пкг/мл; гипоксии «-» — 1,40 (0,81; 2,10) пкг/мл], развития инфекционных осложнений [инфекция «+» — 1,25 (0,73; 2,13) пкг/мл; ин-

On day 15 after trauma, in patients with brain trauma a high negative correlation between the extracellular DNA and necrotic DNA comets ($r=-0,60$), as well as between the extracellular DNA and double-strand breaks ($r=-0,60$), were revealed. The percentage of necrotic DNA comet exhibited high positive correlation ($r=0,709$) with a double-strand DNA breaks. These data indicate that elevated levels of extracellular DNA in plasma of patients with TBI as determined in the blood on day 15, might be due to significant contribution of DNA by not apoptotic rather than necrotic mechanism.

During this period, in patients with TBI, the necrotic DNA comet were formed likely by the mechanism of double-strand breaks.

In patients with SCT + TBI correlations between the indicators of DNA damage were observed on days 3, 7 and 15. On the third day after the trauma, a correlation between apoptotic DNA comets and single, double strand breaks, as well as between double-stranded and single-, double-strand breaks ($r=526$ and $r=659$, respectively) were determined.

On day 7 after the trauma mild correlations between free DNA in plasma and double-strand breaks ($r=307$) and between the free DNA in plasma and single, double-stranded breaks ($r=318$) were revealed. In the same period, the average degree correlation ($r=532$) between apoptotic DNA comets and double-strand breaks was detected.

In patients with SCT and TBI, the death of white blood cells on first week after the trauma occurs by apoptotic mechanism. DNA damage in this case occurs during first three days by a mechanism that includes generation of single-, double-strand breaks, and later mainly by the mechanism linked to generation of double-strand breaks.

In patients with TBI + SCT on day 15 of observation the increased level of extracellular DNA had a slight degree of positive correlation with necrotic ($r=0,359$) and apoptotic ($r=0,419$) DNA comets and high positive correlation ($r=0,587$) with integral (single and double strand breaks) index. There was also a high positive correlation of the level of extracellular DNA in plasma and necrotic double-strand breaks ($r=0,735$), and an average correlation of extracellular DNA AND apoptotic DNA comets ($r=0,582$).

The findings suggest that the increased content of extracellular DNA day 15 might be explained by liberation of DNA from cells of damaged tissues into circulation, along with the significant contribution of DNA from white blood cells damaged by necrotic and apoptotic mechanisms. Hydrolysis of DNA occurs by the mechanism a single breaks and double-strand breaks simultaneously. DNA of white blood cells contributes significantly to the high level of extracellular DNA in patients with TBI + SCT on the 15th day of observation. Necrotic and apoptotic DNA comets are associated with double-strand breaks.

8-hydroxy-2-deoxyguanosine and superoxide dismutase (SOD) in blood plasma of patients

The levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in patients after trauma on day 1 [1.3 (0.8, 2.2) pg/ml, $p<0.05$], day 3 [1.3 (0.71; 2.2) pg/ml, $p<0.05$], day 5 [1.5 (0.77; 2.35) pg/ml, $p<0.05$] and day 7 [1.6 (0.7; 2.3) pg/ml, $p<0.05$] were significantly lower than the values of the control group [3.6 (4.4; 3.2) pg/ml] (fig. 6). In dynamics in the first two weeks of observation a gradual, insignificant increase in this indicator is noted, which by the 15th day of observation remains below normal values almost twice [1.5 (0.56; 2.90) pg/ml] times (fig. 6).

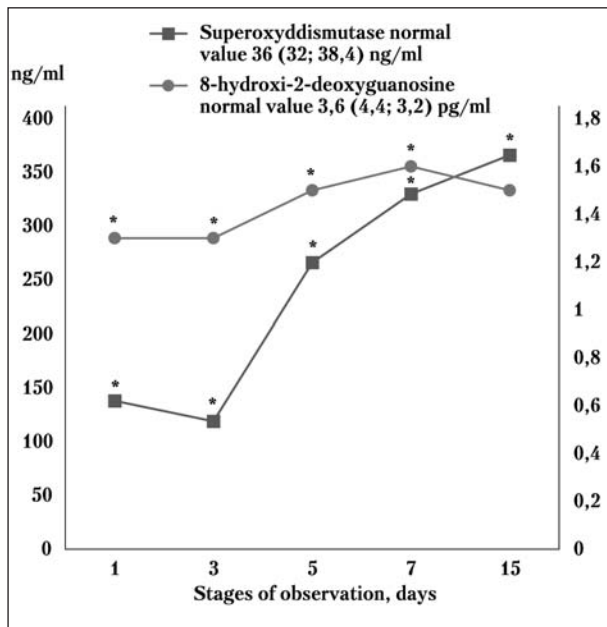


Рис. 6. Содержание 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина и супероксиддисмутазы в плазме крови пострадавших.

Fig. 6. Content of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and superoxide dismutase in the patients' plasma.

Note (Примечание):

Stages of observation, days — этапы исследования, сутки; Normal value — нормальные значения, ng/ml — нг/мл; pg/ml — пкг/мл; 8-hydroxy-2-deoxyguanosine — 8-гидрокси-2-дезоксигуанозин; superoxide dismutase — супероксиддисмутаза.

* — $p < 0,05$ — significant differences between the patient and the control group (достоверные различия между группой пострадавших и группой контроля).

фекция «-» — 1,45 (1,07; 2,33) пкг/мл] и исхода [выжившие — 1,30 (0,99; 2,25) пкг/мл; умершие — 1,10 (0,7; 2,20) пкг/мл] травмы.

Уровень 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в первые сутки после травмы у пострадавших с ЧМТ [1,5 (0,95; 2,20) пкг/мл] был выше по сравнению с другими видами [ТСТ — 1,15 (0,78; 1,60) пкг/мл; ТСТ+ЧМТ — 1,10 (0,73; 2,30) пкг/мл] травмы. При этом активность супероксиддисмутазы у пострадавших с ЧМТ была ниже [98,0 (67,0; 161,0) нг/мл, $n=19$], чем при ТСТ [242 (198; 303,5) нг/мл, $n=4$] и ТСТ+ЧМТ [164 (114; 348) нг/мл, $n=17$].

Получены достоверные различия по уровню 8-гидрокси-2-дезоксигуанозину в группе пострадавших с КП I СТ между 1-ми [1,65 (1,28; 2,58) пкг/мл] и 15-ми [3,20 (2,10; 3,65) пкг/мл, $p < 0,05$] сутками наблюдения. Малые объемы потери крови и отсутствие гипоксии способствует восстановлению количества 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина к концу второй недели наблюдения.

Окисление гуанина в молекуле ДНК сопряжено со свободно-радикальными процессами в клетках и приводит в том числе к образованию 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина. В плазме крови 8-гидрокси-2-дезоксигуанозин появляется вследствие эксцизионной репарации оснований. Увеличение концентрации 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в плазме крови счита-

(0,77, 2,35) pg/ml, $p < 0,05$] and day 7 [1,6 (0,7; 2,3) pg/ml, $p < 0,05$] post-trauma were significantly lower than in the control group [3,6 (4,4, 3,2) pg/ml] (Fig. 6).

During two weeks of observation there was a gradual (slight) increase in its values, and until day 15 of observation it was still lower than normal values almost 2-fold [1.5 (0.56, 2.90) pg/ml] (Fig. 6).

In the general group of patients a significant increase of superoxide dismutase during all period of the observation in comparison to the control level were identified (Fig. 6).

The level of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in patients plasma on the first days after trauma did not depend on the amount of blood loss [I DBL — 1.65 (1.28, 2.58) pg/ml; II DBL — 1.08 (0.59, 1.46) pg/ml; III DBL — 1.30 (0.85, 3.13) pg/ml; IV DBL — 1.10 (0.71, 1.98) pg/ml], severity of hypoxia [hypoxia «+» — 1.45 (0.73, 2.43) pg/ml; hypoxia «-» — 1.40 (0.81, 2.10) pg/ml], development of infectious complications [infection «+» — 1.25 (0.73, 2.13) pg/ml; infection «-» — 1.45 (1.07, 2.33) pg/ml] and outcome [survivors — 1.30 (0.99, 2.25) pg/ml; decased patients — 1.10 (0.7, 2.20) pg/ml].

The level of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in the first days after trauma in patients with TBI [1.5 (0.95, 2.20) pg/ml] was higher as compared to other types of trauma [SCT — 1.15 (0, 78, 1.60) pg/ml; SCT+TBI — 1.10 (0.73, 2.30) pg/ml]. The activity of superoxide dismutase in patients with TBI was lower [98.0 (67.0, 161.0) ng/ml, $n=19$] as compared to the SCT [242 (198, 303.5) ng/ml, $n=4$], and SCT+TBI [164 (114, 348) ng/ml, $n=17$].

Significant differences were obtained in the level of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in the group of patients with I DBL between first [1.65 (1.28, 2.58) pg/ml] and 15th [3.20 (2, 10, 3.65) pg/ml, $p < 0,05$] days of observation. Small amounts of blood loss and the absence of hypoxia seemed to contribute the restoration of the amount of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine by the end of the second week of observation.

Oxidation of guanine in DNA conjugates with free-radical processes in the cells and leads to the formation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine. In the blood plasma 8-hydroxy-2-deoxyguanosine molecules appear due to excision repair of bases. Increase in concentration of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in plasma has been shown to be one of the key biomarkers of oxidative distress in cells and tissues [22].

Nearly threefold reduction in comparison with control in the concentration of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine plasma patients with trauma might be associated with the activation of a mechanism of reparation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine inclusions into DNA by a long reparation pathway. As a result, a certain portion of the blood plasma contained 8-hydroxy-2-deoxyguanosine is represented by an oligonucleotides composition and cannot be detected by ELISA that detect free molecules of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine.

It is necessary to conduct further simultaneous studies of level 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and lipid peroxidation as biomarkers of «oxidative distress» in patients with trauma to justify the advisability of antioxidant therapy in these patients.

ется одним из биомаркеров окислительного дистресса в клетках и тканях [22].

Почти трехкратное, по сравнению с контролем, снижение концентрации 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в плазме крови пострадавших с травмой может быть связано с активацией репарации 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина по механизму long path repair (репарация длинными фрагментами). В результате в плазме крови определенная часть отрепарированного 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина представлена в составе олигонуклеотидов и не может быть детектирована иммуноферментным методом.

Необходимо в дальнейшем проведение одновременного исследования уровня 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина и перекисного окисления липидов как биомаркеров «окислительного дистресса» у пострадавших с травмой для обоснования целесообразности назначения антиоксидантной терапии этим больным.

Выводы

1. Выявлено повышение содержания свободной ДНК в плазме крови пострадавших с относительно контроля на протяжении всего периода наблюдения. В течение первой недели наблюдения имеет место увеличение количества свободной ДНК в плазме, что обусловлено ее поступлением из клеток, поврежденных в результате травмы тканей. Постепенное снижение количества свободной ДНК в плазме пострадавших в течение второй недели после травмы свидетельствует об уменьшении ее поступления из травмированных тканей, увеличение ее элиминации из общего кровотока.

2. В первые две недели после травмы отмечено увеличение ДНК-повреждений и усиление процессов гибели белых клеток крови по некротическому и апоптотическому механизму у пострадавших с различными видами травмы, что, возможно, связано с активным участием лейкоцитов в процессах удаления продуктов клеточного распада поврежденных в результате травмы тканей и предупреждения развития инфекционных осложнений.

3. Гибель белых клеток крови у пострадавших с травмой по некротическому пути не зависит от объема потери крови и степени гипоксии, в то время как по апоптотическому механизму выявлена зависимость гипоксии и интенсивности гибели лейкоцитов у этих больных.

4. Вероятность развития инфекционных осложнений у пострадавших с травмой при кровопотере и гипоксии определяется количеством некротических ДНК-комет и значениями интегрального показателя на 3-й день после травмы. Незначительное увеличение (относительно первых суток) количества некротических ДНК-комет и значений интегрального показателя на 3-й день наблюдения служит плохим прогностическим признаком возможного развития инфекционных осложнений у этих больных.

Conclusion

1. Elevated level of free DNA in the blood plasma of patients in comparison with control group was revealed during all period post-trauma. During the first week after the trauma, free circulating DNA in plasma increased due to the output from damaged cells by trauma of tissues. Gradual decrease of free DNA in patients' plasma during the second week after trauma demonstrates a decrease of output from damaged tissues and an increase in its elimination from the bloodstream.

2. During the first two weeks after the trauma, there was an increase of DNA damage and increased death of white blood cells by necrotic and apoptotic mechanism in patients with different types of trauma that might be associated with the active participation of leukocytes in the process of removing of cells, dissolution of damaged tissues and prevention of infectious complications.

3. Death of white blood cells by necrotic mechanism in patients does not depend on the amount of blood loss and the degree of hypoxia, whereas there is a correlation between the hypoxia and intensity of leukocytes death by apoptotic mechanism.

4. Chances of infectious complications in patients with trauma and blood loss and/or hypoxia might be evaluated by quantifying the percentage of necrotic DNA comets and integral index values on the third day after the trauma. Slight increase (when compared to the first day post-trauma) in relative amount of necrotic DNA comets and integral index values on the third day of observation is considered as a bad prognostic marker demonstrating the increased propensity of developing infectious complications later.

5. The increases in numbers of necrotic DNA comets and integral index values (single, double- breaks of DNA) on the third day after trauma in patients with massive blood loss and severe hypoxia is considered as a good prognostic marker that suggests a lower propensity of developing infectious complications in post-trauma patients.

6. The levels of apoptotic DNA comets derived from white blood cells on the first day after the trauma depend on the amount of a blood loss and the degree of hypoxia. Absence of hypoxia (normal four clinical laboratory parameters and a small amount of blood loss) in patients with trauma leads to a multiple increase in numbers of apoptotic DNA comets on the first day after the trauma. In patients with hypoxia and a large amount of blood loss the amount of apoptotic DNA comets was within normal limits on admission in intensive care unit.

7. There is no correlation between developments of infectious complications in patients with trauma and the numbers of apoptotic DNA comets on day 1 after the trauma. Decrease in apoptotic DNA comets on day 5 post-trauma (compared to day 1) might represent indirect diagnostic criterion of an infectious complication developed in patients with trauma regardless presence or absence hypoxia (as determined by four conventional clinical laboratory parameters). Multiple increase in numbers of apoptotic DNA comets from the 1st to the 5th day of observation might serve as an additional diagnostic criterion of the absence of an infectious

5. Увеличение количества некротических ДНК-комет, значений интегрального показателя (одно-, дву- и трехнитевые разрывы ДНК), на 3-и сутки после травмы при массивной кровопотере и выраженной гипоксии служит хорошим прогностическим признаком, позволяющим предположить малую степень вероятности развития у этих больных инфекционных осложнений.

6. Количество апоптотических ДНК-комет белых клеток крови в первый день после травмы зависит от объема потери крови и степени гипоксии. Отсутствие гипоксии (по 4-м лабораторным показателям и малый объем потери крови) у пострадавших с травмой приводит к многократному увеличению количества апоптотических ДНК-комет лейкоцитов в первый день после травмы. У больных с гипоксией и большим объемом потери крови количество апоптотических ДНК-комет белых клеток крови остается в пределах нормы при поступлении пострадавших в реаниматологическое отделение.

7. Не выявлено зависимости инфекционных осложнений у пострадавших с травмой от количества апоптотических ДНК-комет в 1-й день после травмы. Уменьшение апоптотических ДНК-комет на 5-й день наблюдения (относительно первого дня) может быть косвенным диагностическим критерием развития инфекционных осложнений у пострадавших с травмой независимо от наличия или отсутствия признаков гипоксии (по 4-м лабораторным показателям). Многократное увеличение количества апоптотических ДНК-комет с 1-го по 5-й день наблюдения может быть косвенным диагностическим критерием отсутствия инфекционных осложнений у пострадавших с массивной кровопотерей и выраженной гипоксией (по 4-м лабораторным показателям).

8. Выявлены различия в уровнях ДНК-повреждений, апоптоза и некроза в белых клетках крови у пострадавших с ЧМТ и ТСТ. Малый, и чаще закрытый, объем черепно-мозговой травмы проявляется постоянным в течение двух недель наблюдения уровнем изменений ДНК-повреждений. Массивные повреждения костей и тканей при тяжелой сочетанной травме сопровождается более выраженными изменениями ДНК-по-

вреждений в первую неделю после травмы и постепенным снижением показателей ДНК-повреждений — во вторую неделю.

8. There are differences in the levels of DNA damage, apoptosis and necrosis in white blood cells in patients with TBI and SCT. Small and often closed size of traumatic brain injury is manifested by constant changes in the level of DNA damage during the first two weeks post-trauma. Massive damage of the bones and tissues in patients with severe combined trauma accompanied by more pronounced changes in DNA damage in the first week after the trauma and gradual decrease in DNA damage on the second week.

9. There is a 3-fold reduction in the concentration of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine plasma with trauma patients, accompanied and possibly caused by increased number of superoxide dismutase molecules in leukocytes and/or circulation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author expresses his gratitude to professor Vladimir Mitrofanovich Pisarev for assistance and advice in preparing the article.

The author expresses his gratitude to professor Arcady Michaylovich Golubev for valuable advice and active discussion of the findings.

вреждений в первую неделю после травмы и постепенным снижением показателей ДНК-повреждений — во вторую неделю.

9. Выявлено трехкратное снижение концентрации 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в плазме крови пострадавших с травмой, сопровождающееся и, возможно, обусловленное увеличением количества супероксиддисмутазы.

БЛАГОДАРНОСТИ:

Авторы выражают благодарность профессору Писареву В. М. за помощь и советы при подготовке статьи.

Авторы выражают благодарность профессору Голубеву А. М. за помощь в обсуждении полученных результатов.

Литература

1. Proskuryakov S., Konoplyannikov A.G., Gabai V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* 2003; 283 (1): 1–16. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4827\(02\)00027-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4827(02)00027-7). PMID: 12565815
2. Sabzi F., Niazi M., Zokaei A.H., Sahebjamie F., Bazargan Hejazi S., Ahmadi A. Ventricular septal necrosis after blunt chest trauma. *J. Inj. Violence Res.* 2012; 4 (2): 98–100. <http://dx.doi.org/10.5249/jivr.v4i2.97>. PMID: 22071450
3. Новиков В.С. Программированная клеточная гибель. СПб.: Наука; 1996: 276.
4. Gewies A. Introduction to apoptosis. *ApoReview.* 2003; 1–26.
5. Chaabane W., User S.D., El-Gazzah M., Jaksik R., Sajjadi E., Rzeszowska-Wolny J., Los M.J. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 2013; 61 (1): 43–58. <http://dx.doi.org/10.1007/s00005-012-0205-y>. PMID: 23229678

References

1. Proskuryakov S., Konoplyannikov A.G., Gabai V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* 2003; 283 (1): 1–16. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4827\(02\)00027-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4827(02)00027-7). PMID: 12565815
2. Sabzi F., Niazi M., Zokaei A.H., Sahebjamie F., Bazargan Hejazi S., Ahmadi A. Ventricular septal necrosis after blunt chest trauma. *J. Inj. Violence Res.* 2012; 4 (2): 98–100. <http://dx.doi.org/10.5249/jivr.v4i2.97>. PMID: 22071450
3. Novikov V.S. Programirovannaya kletochnaya gibel. [Programmed cell death]. Sankt-Peterburg: Nauka; 1996: 276. [In Russ.]
4. Gewies A. Introduction to apoptosis. *ApoReview.* 2003; 1–26.
5. Chaabane W., User S.D., El-Gazzah M., Jaksik R., Sajjadi E., Rzeszowska-Wolny J., Los M.J. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 2013; 61 (1): 43–58. <http://dx.doi.org/10.1007/s00005-012-0205-y>. PMID: 23229678

6. *Rastogi R.P., Sinha R.P.* Apoptosis molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI J.* 2009; 8: 155–181.
7. *Тамакович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П.* Циркулирующие ДНК крови и их использование в медицинской диагностике. *Молекулярная биология.* 2008; 42 (1): 12–23. PMID: 18389615
8. *Боровкова Н.В., Валетова В.В., Тимербаев В.Х., Казаков М.Г., Никитина О.В., Хватов В.Б.* Реакция лейкоцитов и апоптоз лимфоцитов периферической венозной крови как маркер тканевой ишемии при острой массивной кровопотере. *Общая реаниматология.* 2013; 9 (4): 18–22.
9. *Summers C., Rankin S.M., Condliffe A.M., Singh N., Peters A.M., Chilvers E.R.* Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010; 31 (8): 318–324. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2010.05.006>. PMID: 20620114
10. *von Vietinghoff S., Ley K.* Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J. Immunol.* 2008; 181 (8): 5183–5188. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5183>. PMID: 18832668
11. *Гостищев В.К., Косинцев В.А., Матусевич Е.А., Адаменко Г.П.* Иммунологические аспекты экспериментального гнойного перитонита. *Новости хирургии.* 2011; 19 (5): 3–8.
12. *Redwan M., Odemuyiwa S.O., Lacy P., Adamko D.J.* The human eosinophil. In: *Greer J.P., Foerster J., Rodgers G.M., Paraskevas F., Glader B., Arber D.A., Means R.T.* Wintrobe's Clinical Hematology. vol. 1. Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins; 2009: 217–223.
13. *Taylor G.A., Weinberg J.B.* Phagocytosis. In: *Greer J.P., Foerster J., Rodgers G.M., Paraskevas F., Glader B., Arber D.A., Means R.T.* Wintrobe's Clinical Hematology. vol. 1. Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins. 2009: 281–300.
14. *Рябов Г.А.* Гипоксия критических состояний. М.: Медицина; 1988.
15. *Яковлев А.Ю., Кичин В.В., Никольский В.О., Калентьев Г.В., Рябиков Д.В., Рябикова М.А., Протасов Д.М., Галанина Т.А., Сморгалов А.Ю., Евдокимова О.С.* Эффективность применения стерофундина изотонического после острой массивной кровопотери в эксперименте. *Общая реаниматология.* 2013; 9 (3): 24–29.
16. *Токмакова Т.О., Пермякова С.Ю., Киселева А.В., Шукевич Д.Л., Григорьев Е.В.* Мониторинг микроциркуляции в критических состояниях: возможности и ограничения. *Общая реаниматология.* 2012; 8 (2): 74–78.
17. *Kasai H., Hirano T., Kawai K., Tsurudome Y., Itoh H., Himeji D., Horiuchi T.* Analysis of 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine as a marker of oxidatively damaged DNA in relation to carcinogenesis and aging. In: *Evans M.D., Cooke M.S.* Oxidative damage to nucleic acids. USA: Landes Bioscience and Springer Science Business Media; 2007: 178–187.
18. *Капитонов В.М., Остапченко Д.А.* «Оксидативный стресс» и его коррекция у больных с тяжелой сочетанной травмой. *Общая реаниматология.* 2010; 6 (4): 70–75.
19. *Shin C.S., Moon B.S., Park K.S., Kim S.Y., Park S.J., Chung M.H., Lee H.K.* Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes Care.* 2001; 24 (4): 733–737. PMID: 11315839
20. *Rivera M., Roselló-Lletí E., García de Burgos F., Bertomeu V., Payá R., Cortés R., Martínez-Dolz L., Jordán A., Pérez-Boscá J. L., Salvador A., Marín F., Sogorb F., Valero R., Miró V., Portolés M.* 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine and lipid peroxidation in patients with heart failure. *Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed.).* 2006; 59 (11): 1140–1145. [http://dx.doi.org/10.1016/S1885-5857\(07\)60063-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1885-5857(07)60063-2). PMID: 17144989
21. *Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis C.* 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 2009; 27 (2): 120–139. <http://dx.doi.org/10.1080/10590500902885684>. PMID: 19412858
22. *Жанатаев А.К., Дурнев А.Д., Середенин С.Б.* Перспективы определения 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в качестве биомаркера окислительного стресса в эксперименте и клинике. *Вестник РАМН.* 2002; 2: 45–49. PMID: 11924129
23. *Rady M.Y.* The role of central venous oximetry, lactic acid concentration and shock index in the evaluation of clinical shock: a review. *Resuscitation.* 1992; 24 (1): 55–60. PMID: 1332162
24. *Gutierrez G., Reines H.D., Wulf-Gutierrez M.E.* Clinical review: hemorrhagic shock. *Crit. Care.* 2004; 8 (5): 373–381. PMID: 15469601
25. *Левитэ Е.М., Бобринская И.Г., Чернова Е.А.* Операционная кровопотеря: измерение, лечение. *Рос. мед. журнал.* 2006; 3: 16–19.
26. *Zhanataev A.K., Moroz V.V., Durnev A.D., Muravyeva M.Yu., Reshetnyak V.I.* DNA damage and cell death assessment in patients with severe multiple trauma using comet assay: a pilot study. *Medicina Danas.* 2009; 8 (10–12): 361–368.
27. *Сорочинская У.Б., Михайленко В.М.* Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды. *Онкология.* 2008; 10 (3): 303–309.
28. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999.
29. *Хубутия М.Ш., Шабанов А.К., Скулачев М.В., Булава Г.В., Савченко И.М., Гребенчиков О.А., Сергеев А.А., Зоров Д.Б., Зиювкин Р.А.* Ми-
6. *Rastogi R.P., Sinha R.P.* Apoptosis molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI J.* 2009; 8: 155–181.
7. *Tamakovich S.N., Vlasov V.V., Laktionov P.P.* Tsirkuliruyushchie DNK krovi i ikh ispolzovanie v meditsinskoj diagnostike. [Circulating deoxyribonucleic acids in blood and their using in medical diagnostics]. *Molekulyarnaya Biologiya.* 2008; 42 (1): 12–23. PMID: 18389615. [In Russ.]
8. *Borovkova N.V., Valetova V.V., Timerbayev V.Kh., Kazakov M.G., Nikitina O.V., Khvatov V.B.* Reaktsiya leukotsitov i apoptoz limfotsitov perifericheskoi venoznoi krovi kak marker tkanevoi ishemii pri ostroi massivnoi krvopotere. *Obshchaya Reanimatologiya.* [Leukocytic response and peripheral venous blood lymphocyte apoptosis as a marker of tissue ischemia in acute massive blood loss. *General Reanimatology.*] 2013; 9 (4): 18–22. [In Russ.]
9. *Summers C., Rankin S.M., Condliffe A.M., Singh N., Peters A.M., Chilvers E.R.* Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010; 31 (8): 318–324. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2010.05.006>. PMID: 20620114
10. *von Vietinghoff S., Ley K.* Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J. Immunol.* 2008; 181 (8): 5183–5188. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5183>. PMID: 18832668
11. *Gostishchev V.K., Kosinets V.A., Matushevich E.A., Adamenko G.P.* Immunologicheskie aspekty eksperimentalnogo gnoynogo peritonita. [Immunological aspects of experimental purulent peritonitis]. *Novosti Khirurgii.* 2011; 19 (5): 3–8. [In Russ.]
12. *Redwan M., Odemuyiwa S.O., Lacy P., Adamko D.J.* The human eosinophil. In: *Greer J.P., Foerster J., Rodgers G.M., Paraskevas F., Glader B., Arber D.A., Means R.T.* Wintrobe's Clinical Hematology. vol. 1. Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins; 2009: 217–223.
13. *Taylor G.A., Weinberg J.B.* Phagocytosis. In: *Greer J.P., Foerster J., Rodgers G.M., Paraskevas F., Glader B., Arber D.A., Means R.T.* Wintrobe's Clinical Hematology. vol. 1. Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins. 2009: 281–300.
14. *Ryabov G.A.* Gipoksiya kriticheskikh sostoyanii. [Hypoxia in critical conditions]. Moscow: Meditsina Publishers; 1988: 287. [In Russ.]
15. *Yakovlev A.Yu., Kichin V.V., Nikolsky V.O., Kalentyev G.V., Ryabikov D.V., Ryabikova M.A., Protasov D.M., Galanina T.A., Smorkalov A.Yu., Evdokimova O.S.* Effektivnost primeneniya sterofundina izotonicheskogo posle ostroi massivnoi krvopoteri v eksperimente. *Obshchaya Reanimatologiya.* [Efficacy of employment of isotonic sterofundin after experimental hemorrhagic shock. *General Reanimatology.*] 2013; 9 (3): 24–29. [In Russ.]
16. *Tokmakova T.O., Permyakova S.Yu., Kiseleva A.V., Shukevich D.L., Grigoryev E.V.* Monitoring mikrotsirkulyatsii v kriticheskikh sostoyaniyakh: vozmozhnosti i ogranicheniya. *Obshchaya Reanimatologiya.* [Microcirculation monitoring in critical conditions: Possibilities and limitations. *General Reanimatology.*] 2012; 8 (2): 74–78. [In Russ.]
17. *Kasai H., Hirano T., Kawai K., Tsurudome Y., Itoh H., Himeji D., Horiuchi T.* Analysis of 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine as a marker of oxidatively damaged DNA in relation to carcinogenesis and aging. In: *Evans M.D., Cooke M.S.* Oxidative damage to nucleic acids. USA: Landes Bioscience and Springer Science Business Media; 2007: 178–187.
18. *Kapitonov V.M., Ostapchenko D.A.* «Oksiditelyni stress» i ego korrektsiya u bolnykh s tyazheloi sochetannoi travmoy. *Obshchaya Reanimatologiya.* [Oxidative stress and its correction in patients with severe concomitant injury. *General Reanimatology.*] 2010; 6 (4): 70–75. [In Russ.]
19. *Shin C.S., Moon B.S., Park K.S., Kim S.Y., Park S.J., Chung M.H., Lee H.K.* Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes Care.* 2001; 24 (4): 733–737. PMID: 11315839
20. *Rivera M., Roselló-Lletí E., García de Burgos F., Bertomeu V., Payá R., Cortés R., Martínez-Dolz L., Jordán A., Pérez-Boscá J. L., Salvador A., Marín F., Sogorb F., Valero R., Miró V., Portolés M.* 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine and lipid peroxidation in patients with heart failure. *Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed.).* 2006; 59 (11): 1140–1145. [http://dx.doi.org/10.1016/S1885-5857\(07\)60063-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1885-5857(07)60063-2). PMID: 17144989
21. *Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis C.* 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 2009; 27 (2): 120–139. <http://dx.doi.org/10.1080/10590500902885684>. PMID: 19412858
22. *Zhanataev A.K., Durnev A.D., Seredenin S.B.* Perspektivy opredeleniya 8-gidroksi-2-dezoksiguanozina v kachestve biomarkera oksiditelynogo stressa v eksperimente i klinike. [Prospects of experimental and clinical determination of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine as a biological marker of oxidative stress]. *Vestnik RAMN.* 2002; 2: 45–49. PMID: 11924129. [In Russ.]
23. *Rady M.Y.* The role of central venous oximetry, lactic acid concentration and shock index in the evaluation of clinical shock: a review. *Resuscitation.* 1992; 24 (1): 55–60. PMID: 1332162
24. *Gutierrez G., Reines H.D., Wulf-Gutierrez M.E.* Clinical review: hemorrhagic shock. *Crit. Care.* 2004; 8 (5): 373–381. PMID: 15469601

- тохондриальная и ядерная ДНК у пострадавших с тяжелой сочетанной травмой. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (6): 24–29.
30. Галкин А.А., Демидова В.С. Повреждение защитных функций нейтрофилов на ранней стадии ожоговой болезни. *Усп. соврем. биологии*. 2012; 132 (3): 297–311.
 31. Тронов В.А., Никольская Т.Н., Коноплинников М.А. ДНК-кометы как маркер клеточной гибели. *Биофизика*. 1999; 44 (2): 288–295. PMID: 10418679
 32. Афанасьев Г.Г., Иваненко Т., Крушевский М., Пелевина И.И. Повреждения ДНК, их репарация и апоптоз в отдаленных поколениях клеток L5178Y(R) после радиационного воздействия (метод ДНК-комет). *Цитология*. 1997; 39 (8): 740–746. PMID: 9490513
 33. Шабанов А.К., Хубутия М.Ш., Булава Г.В., Белобородова Н.В., Кузовлев А.Н., Гребенчиков О.А., Косолапов Д.А., Шпитонков М.И. Динамика уровня прокальцитонина при развитии нозокомиальной пневмонии у пострадавших с тяжелой сочетанной травмой. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (5): 11–17.
- Поступила 30.02.14**
25. Levite E.M., Bobrinskaya I.G., Chernova E.A. Operatsionnaya krovopoterya: izmerenie, lechenie. [Operative blood loss: Measurement, treatment]. *Rossiyskiy Meditsinskiy Zhurnal*. 2006; 3: 16–19. [In Russ.]
 26. Zhanataev A.K., Moroz V.V., Durnev A.D., Muravyeva M.Yu., Reshetnyak V.I. DNA damage and cell death assessment in patients with severe multiple trauma using comet assay: a pilot study. *Medicina Danas*. 2009; 8 (10–12): 361–368.
 27. Sorochinskaya U.B., Mikhailenko V.M. Primenenie metoda DNK-komet dlya otsenki povrezhdenii DNK, vyzvannykh razlichnymi agentami okruzhayushchei sredy. [Use of DNA comet method to evaluate DNA damages caused by different environmental agents]. *Onkologiya*. 2008; 10 (3): 303–309. [In Russ.]
 28. Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. [Biomedical statistics]. Moscow: Praktika; 1999. [In Russ.]
 29. Khabutia M.Sh., Shabanov A.K., Skulachev M.V., Bulava G.V., Savchenko I.M., Grebenchikov O.A., Sergeev A.A., Zorov D.B., Zinovkin R.A. Mitochondrialnaya i yadernaya DNK u postradavshikh s tyazheloi sochetannoi travmoi. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Mitochondrial and nuclear DNA in patients with severe polytrauma. *General Reanimatology*]. 2013; 9 (6): 24–29. [In Russ.]
 30. Galkin A.A., Demidova V.S. Povrezhdenie zashchitnykh funktsii neutrofilov na rannei stadii ozhogovoi bolezni. [Protective neutrophil dysfunction in the early stage of burn disease]. *Uspekhi Sovremennoi Biologii*. 2012; 132 (3): 297–311. [In Russ.]
 31. Tronov V.A., Nikolskaya T.N., Konoplyannikov M.A. DNK-komety kak marker kletochnoi gibeli. [Dna comets as markers of cells death]. *Biofizika*. 1999; 44 (2): 288–295. PMID: 10418679. [In Russ.]
 32. Afanasyev G.G., Ivanenko T., Krushevsky M., Plevina I.I. Povrezhdeniya DNK, ikh reparatsiya i apoptoz v otdalennykh pokoleniyakh kletok L5178Y(R) posle radiatsionnogo vozdeistviya (metod DNK-komet). [DNA damages, their repair and apoptosis in the distant descendants of L5178Y(R) cells following radiation exposure (the DNA-comet method)]. *Tsitologiya*. 1997; 39 (8): 740–746. PMID: 9490513. [In Russ.]
 33. Shabanov A.K., Khabutia M.Sh., Bulava G.V., Beloborodova N.V., Kuzovlev A.N., Grebenchikov O.A., Kosolapov D.A., Shpitonkov M.I. Dinamika urovnya prokaltsitonina pri razvitii nozokomialnoi pnevmonii u postradavshikh s tyazheloi sochetannoi travmoi. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Time course of changes in the level of procalcitonin in the development of nosocomial pneumonia in victims with severe concomitant injury in an intensive care unit. *General Reanimatology*]. 2013; 9 (5): 11–17. [In Russ.]

Submitted 30.02.14