

С.Б. Оникиенко<sup>1</sup>, А.В. Земляной<sup>2</sup>,  
В.И. Попов<sup>1</sup>, Ю.И. Листопадов<sup>1</sup>

## Средство на основе белка теплового шока-70 для защиты от травматического токсикоза, повышения устойчивости к травме и кровопотере

<sup>1</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека,  
Ленинградская область, Всеволожский р-н, пос. Кузьмолово

**Резюме.** На основе белка теплового шока-70 созданы средства защиты от травматического токсикоза, повышения устойчивости к травме и кровопотере. Белок теплового шока-70 и его производные пролонгированного действия – конъюгат с полиэтиленгликолем и гибридный белок с Fc-фрагментом антител человека повышают выживаемость животных при долговременном сдавливании мягких тканей, препятствуют развитию травматического токсикоза, системной воспалительной реакции, лейкоцитарной инфильтрации органов мишени, рабдомиолиза, почечной, печеночной недостаточности, отека легких. Защитный эффект наиболее выражен у гибридного белка теплового шока-70 с Fc-фрагментом иммуноглобулинов человека. Препараты на основе белка теплового шока-70 повышают выживаемость животных при массивной кровопотере, подавляют системную воспалительную реакцию, снижают активность аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы, креатинфосфокиназы, уровень креатинина в крови; значительно увеличивают продолжительность жизни при геморрагическом шоке. Стратегия увеличения продолжительности жизни при массивной кровопотере расширяет границы так называемого «золотого часа» и позволяет доставить раненых и пострадавших в специализированные медицинские учреждения и спасти им жизнь. Препараты на основе белка теплового шока-70 повышают устойчивость к травме и кровопотере, предотвращают развитие краш-синдрома при длительной компрессионной травме мягких тканей, геморрагического шока и его осложнений при массивной кровопотере; они являются перспективными средствами для применения у раненых и пострадавших при стихийных бедствиях, техногенных авариях и катастрофах.

**Ключевые слова:** устойчивость к травме и кровопотере, геморрагический шок, травматический токсикоз, отек легких, почечная и печеночная недостаточность, выживаемость, системное воспаление, белок теплового шока-70, конъюгат белка теплового шока-70 с полиэтиленгликолем, гибридный белок теплового шока-70 с Fc-фрагментом антител человека.

**Введение.** Защита от травматического токсикоза, повышение индивидуальной устойчивости к травме и массивной кровопотере является актуальной задачей военной и экстремальной медицины [1, 2, 4, 9–11]. Основной причиной смерти от ранений и травм в мирное и военное время является геморрагический шок, с ним связаны развитие синдрома системного воспалительного ответа и полиорганной недостаточности [5]. Устойчивость к кровопотере повышают эритропоэтин [19], перфторан [8], защитный белок HDFx [12], некоторые полипептиды [2] и индукторы защитных белков стресса – белков теплового шока-70 (БТШ70) [14, 15]. Они повышают выживаемость, препятствуют развитию геморрагического шока и его осложнений при массивной кровопотере. Иммуноциткины играют важную роль в патогенезе почечной и печеночной недостаточности при длительном сдавливании мягких тканей [1]. Дексаметазон [16], антитела к цитокину HMGB1 [17], эритропоэтин [18], перфторан [6], антигипоксанты [3] и защитный белок HDFx [13] препятствуют развитию травматического токсикоза.

**Цель исследования.** Выявить перспективность применения БТШ70 и их производных пролонгированного действия для защиты от травматического токсикоза, повышения устойчивости к травме и кровопотере, предотвращения развития почечной и печеночной недостаточности при компрессионной травме мягких тканей, геморрагического шока и его осложнений у раненых и пострадавших при стихийных бедствиях, техногенных авариях и катастрофах.

**Материалы и методы.** Рекомбинантные БТШ70 и их производные пролонгированного действия – конъюгат БТШ70 с полиэтиленгликолем (БТШ70-ПЭГ) и гибридные белки на основе БТШ70 и Fc-фрагмента антител человека (БТШ70-Fc) применяли для повышения устойчивости к травме и кровопотере у экспериментальных животных. Исследования проведены на 200 крысах-самцах линии Вистар массой тела 190–240 г. Травматический токсикоз моделировали у крыс под наркозом (нембутал, 40 мг/кг) при 6-часовом сдавливании мягких тканей бедра в специальных тисках площадью 5 см<sup>2</sup> с желобообразным вырезом

(для предупреждения перелома бедренной кости). Сила компрессии – 5 кг/см<sup>2</sup>. Пробы крови для анализа забирали из катетера в яремной вене через 3, 6, 12 и 24 ч после снятия тисков. Животные были разделены на 5 групп (n=20). БТШ70 вводили внутривенно в дозе 100 мкг на крысу сразу после прекращения компрессии мягких тканей обеих бедер или ежедневно в течение 3 сут до массивной кровопотери. Животным 1-й группы вводили БТШ70, 2-й группы – БТШ70-ПЭГ, 3-й группы – БТШ70-Fc, 4-й группы – физиологический раствор в том же объеме (контроль), 5-я группа – интактные животные. Через 7 суток после травмы определяли выживаемость животных. После эвтаназии выживших животных забирали их органы: мышцы сдавливаемых конечностей, почки, печень, легкое, сердце для изучения морфологических изменений. Биоптаты окрашивали гематоксилин-эозином. Массивную кровопотерю осуществляли на 4-й день эксперимента у 1–4-й группы наркотизированных животных (нембутал, 40 мг/кг). Кровь забирали через катетер в хвостовой артерии в объеме 2,5 мл/100 г со скоростью 2 мл/мин до достижения среднего артериального давления (АД)=30±5 мм рт. ст., которое поддерживали в течение 60 мин путем дополнительного забора или инфузии раствора Рингера. Гиповолемию восполняли в течение 60 мин в объеме 200% от кровопотери раствором Рингера. Использовали систему неинвазивного контроля АД животных – аппарат «NIBP200A» фирмы «Віорас Systems, Ins.» (Соединенные Штаты Америки). В плазме крови крыс определяли уровень интерлейкинов (ИЛ) ИЛ-6, ИЛ-10 (иммуноферментный анализатор «PersonalLAB» фирмы «Adaltis» (Италия)), креатинин, калий, мочевины, активность аланинаминотрансферазы (АлТ), аспартатаминотрансферазы (АсТ), креатинфосфокиназы (КФК) определяли на анализаторе «SAPPHIRE-400» фирмы «Токуо Воєки Ltd.» (Япония).

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что БТШ70 и их производные пролонгированного действия достоверно повышают выживаемость экспериментальных животных при травматическом токсикозе. При этом выживаемость в группе контроля составила 20% (4/20). В результате введения БТШ70, БТШ70-РЕГ и БТШ70-Fc выживаемость повысилась до 50% (8/20), 65% (13/20) и 90% (18/20) соответственно. Повышение противовоспалительных цитокинов под влиянием БТШ70 и их производных свидетельствует о том, что они препятствуют развитию системной иммунной воспалительной реакции при травматическом токсикозе. БТШ70 и его производные защищают органы-мишени от поражений, препятствуют развитию рабдомиолиза, почечной и печеночной недостаточности (табл. 1). Маркерами рабдомиолиза являются повышение уровня калия, активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), КФК и АсТ; поражения почек – повышение уровня креатинина и азота мочевины; печени – повышение уровня АлТ.

Защитный эффект БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc достоверно (p≤0,05) более выражен в сравнении с применением не модифицированного рекомбинантного БТШ70.

Результаты морфометрии биоптатов свидетельствуют о том, что долговременное сдавливание мягких тканей сопровождается развитием лейкоцитарной инфильтрации органов-мишеней, которая наиболее выражена в мышцах, тканях почек и легких. В мышцах развиваются признаки рабдомиолиза, в почках – белковая дистрофия эпителия канальцев с формированием в их просвете гомогенных слепков; в легких – признаки интерстициального отека, фибрин выходит в просвет альвеол, формируются интраальвеолярные геморрагии, единичные ателектазы. Препараты на основе БТШ70 значительно уменьшают лейкоцитарную инфильтрацию органов-мишеней и предотвра-

Таблица 1

**Влияние БТШ70 на выживаемость животных через 7 суток после 6-часового сдавливания мягких тканей бедра, а также на биохимические показатели и уровень ИЛ-6, ИЛ-10 в сыворотке крови крыс через 24 ч после травмы, M±m**

Показатель	Группа животных				
	1	2	3	4	5
Выживаемость	50%*	65%*	90%*	20%	100%
ИЛ-6, пг/мл	1238±55*	966±105*	859±5*	3245,5±387,7	67,7±3,7
ИЛ-10, пг/мл	283±41*	325,6±56,5*	454±80*	108,4±13,6	20,5±2,4
ИЛ-6/ИЛ-10	5,33*	2,97*	1,89*	30,04	5,14
Мочевина, г/л	43,5±5,2*	39,2±5,6*	31,5±5,7*	59,7±7,4	13,7±2,2
Калий, ммоль/л	5,44±0,31*	5,73±0,29*	5,21±0,52*	7,12±0,33	4,25±0,23
Креатинин, г/л	0,84±0,09*	0,75±0,09*	0,59±0,11*	1,28±0,30	0,32±0,04
АлТ, ЕД/л	1940±156*	1513±110*	1296±196*	4538 ±295	76,5±9,4
АсТ, ЕД/л	655±40*	516,8±66,2*	486±75*	720 ±166	64,6±7,7
КФК, ЕД/л	8758±766*	6632±849*	5214±747*	14620±2012	258±65
ЛДГ, ЕД/л	3851±738*	3118±710*	2830±658*	5989 ±695	210±9

**Примечание:** \* – различия в сравнении с контролем, p≤0,05.

щают развитие их поражений при травматическим токсикозе. Наиболее выраженными защитными свойствами обладают гибридные белки на основе БТШ70 и Fc-фрагмента антител человека.

Установлено, что прием БТШ70 и их производных пролонгированного действия повышает выживаемость экспериментальных животных при острой массивной кровопотере. В группе контроля она составила 15%, в результате профилактического введения БТШ70, БТШ70-PEG и БТШ70-Fc выживаемость повысилась до 55, 80 и 90%, соответственно, что в 3,7–6 раз больше, чем в группе контроля. Защитный эффект БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc был достоверно более выражен, чем у не модифицированного рекомбинантного БТШ70. Изменение соотношения провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-6/ИЛ-10) под влиянием БТШ70 и их производных препятствует поражению органов-мишеней, развитию системной иммунной воспалительной реакции, которая является проявлением геморрагического шока (табл. 2).

Выявлено, что БТШ70 и их производные пролонгированного действия препятствуют повышению активности АлТ, АсТ, КФК и уровня креатинина при острой массивной кровопотере. Это свидетельствует о том, что эти препараты защищают органы-мишени (сердце, печень, почки) от поражений при острой массивной кровопотере. Показано, что БТШ70 значительно увеличивают продолжительность жизни при геморрагическом шоке (табл. 3).

Препараты БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc обладают более выраженными защитными свойствами в сравнении с не модифицированным рекомбинантным БТШ70.

Известно, что раненые и пострадавшие с травмами и массивной кровопотерей часто погибают из-за невозможности своевременного оказания им специализированной медицинской помощи. Стратегия увеличения продолжительности жизни при геморрагическом шоке расширяет границы так называемого «золотого часа» и позволяет доставить раненых и пострадавших в специализированные медицинские учреждения и спасти им жизнь.

Полученные в эксперименте результаты служат основанием для проведения исследований по изучению эффективности БТШ70 для профилактики геморрагического шока и его осложнений у больных с острой массивной кровопотерей. Предварительные результаты свидетельствуют о том, что внутривенное введение 0,5–1,0 мг БТШ70 ежедневно во время профузного желудочного кровотечения и последующие 3-е суток предотвращает развитие геморрагического шока, повышает устойчивость пациентов (5 чел) к массивной кровопотере.

**Заключение.** Применение рекомбинантных БТШ70 и их производных пролонгированного действия – БТШ70-ПЭГ и БТШ70-Fc являются перспективными средствами защиты от травматического токсикоза, предотвращения развития острой почечной и печеночной недостаточности при тяжелой компрессионной травме, повышения устойчивости организма к кровопотере, предотвращения развития геморрагического шока и его осложнений у раненых и пострадавших.

**Литература**

1. Азнаурян, А.В. Иммуноцитокны в развитии краш-синдрома / А.В. Азнаурян, М.Ю. Артищева, А.С. Азнаурян // Морфология, 2006. – Т. 129. – № 4. – С. 6.
2. Барташевич, Б.И. Компрессионная травма – синдром длительного сдавливания / Б.И. Барташевич, И.Б. Карлова // Врач скорой помощи. – 2010. – № 5. – С. 591–596.
3. Зарубина, И.В. Метаболическая коррекция полиорганной недостаточности в раннем периоде травматического токсикоза

Таблица 3

**Влияние БТШ70 на продолжительность жизни при геморрагическом шоке у крыс, M±m**

Показатель	Группа животных			
	1	2	3	4
Продолжительность жизни, мин	235±45*	278±49*	348±35*	69±9

**Примечание:** \* – различия в сравнении с контролем, p<0,05.

Таблица 2

**Влияние БТШ70 на выживаемость, уровень ИЛ-6, ИЛ-10 и ферментную активность в крови крыс через 24 ч после острой массивной кровопотери, M±m**

Показатель	Группа животных				
	1	2	3	4	5
Выживаемость, %	55*	80*	90*	15	100
ИЛ6, пг/мл	438±55*	406±55*	360±44*	2230±265	37,5±1,6
ИЛ10, пг/мл	184±40*	226±37*	254±40*	28,5±7,5	7,3±0,9
ИЛ-6/ИЛ-10	2,40*	1,79*	1,41*	76,98	5,14
Креатинин, мкмоль/л	145±5*	130±5*	109±5*	170±6	74,7±4,8
АлТ, ЕД/л	440±50*	412±50*	396±46*	1019±179	46,7±2,4
АсТ, ЕД/л	470±45*	416±47*	347±46*	1149±166	64,8±2,7
КФК, ЕД/л	758±67*	633±58*	514±50*	8681±213	99,7±5,8

**Примечание:** \* – различия в сравнении с контролем, p ≤ 0,05

- / И.В. Зарубина // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, 2012. – № 4. – С. 3–15.
4. Кувакин, В.И. Ретроспективный анализ травматизма и состояние травматолого-ортопедической помощи населению на рубеже XX–XXI веков / В.И. Кувакин, А.Ж. Чёрный, Т.Н. Воронцова // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2013. – № 3 (43) – С 1–5.
  5. Кудлай, Д.А. Самсонова Содержание альдостерона, калия и натрия к сыворотке больных с множественной травмой / Д.А. Кудлай, А.Р. Антонов, Ю.В. Начаров, Е.Н. Самсонова // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2006 – № 1 (15) – С 49–52.
  6. Магомедов, К.К. Коррекция перфтораном структурно-функционального гомеостаза при синдроме длительного сдавления: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / К.К. Магомедов. – Ростов-на-Дону. – 2012. – 24 с.
  7. Мацневский, Д.Д. Индивидуальная устойчивость к острой кровопотере - реальность и проблемы / Д.Д. Мацневский, Н.Я. Коваленко // Патогенез. – 2004. – № 2. – С. 53–66.
  8. Мороз, В.В. Влияние перфторана на морфологию эритроцита при острой кровопотере / В.В. Мороз [и др.] // Общая реаниматология. – 2013. – № 5. – С. 5–10.
  9. Пат. № 2403911 Российская Федерация, МПК А61К38/08. Средство для увеличения выживаемости при острой кровопотере / Чазов, Е.И., Беспалова Ж.Д., Лакомкин В.Л. [и др.]; опубл. 20.11.2010, Би № 32.
  10. Трухан, А.П. Влияние силы компрессии конечности на выраженность морфологических изменений при синдроме длительного сдавления / А.П. Трухан [и др.] // Новости хирургии, 2013. – № 5. – С. 18–23.
  11. Чернышева, Г.А. Особенности течения шока при синдроме длительного раздавливания у крыс с разной устойчивостью к шокогенной травме / Г.А. Чернышева [и др.] // Бюлл. эксперим. биол. мед. 2001. – № 10. – С. 390–393.
  12. Altura, B.M. HDFx: a novel biologic immunomodulator is therapeutically effective in hemorrhagic and intestinal-ischemic shock: importance of microcirculatory-immunological interactions and their potential implications for the warfighter and disaster victims / B.M. Altura, A. Carella, A. Gebrewold // Int. j. clin. exp. med. – 2011. – Vol. 4. – № 4. – P. 331–340.
  13. Altura, B.M. HDFx: a novel biologic immunomodulator accelerates wound healing and is suggestive of unique regenerative powers: potential implications for the war fighter and disaster victims / B.M. Altura, A. Carella, A. Gebrewold // Int. j. clin. experim. med. – 2012. – Vol. 5. – № 4. – P. 289–295.
  14. Cotogni, P. Pyrrolidine dithiocarbamate modulates HSP70, iNOS, and apoptosis during hemorrhagic shock resuscitation in rats / P. Cotogni [et al.] // J. invest. surg. – 2010. – Vol. 23. – № 6. – P. 295–302.
  15. Hwabejire, J.O. Valproic acid for the treatment of hemorrhagic shock: a dose-optimization study / J.O. Hwabejire [et al.] // J. surg. res. – 2014. – Vol. 186. – № 1. – P. 363–370.
  16. Murata, I. Acute lethal crush-injured rats can be successfully rescued by a single injection of high-dose dexamethasone through a pathway involving PI3K-Akt-eNOS signaling / I. Murata [et al.] // J. trauma acute care surg. – 2013. – Vol. 75. – № 2. – P. 241–249.
  17. Nandra, K.K. Pharmacological preconditioning with erythropoietin attenuates the organ injury and dysfunction induced in a rat model of hemorrhagic shock / K.K Nandra [et al.] // Dis. model. mech. – 2013. – Vol. 6 – № 3. – P. 701–709.
  18. Sanchis-Gomar, F. Erythropoietin receptor agonist is used to treat a wide range of disease // F. Sanchis-Gomar, C. Perez-Quilis, G. Lippi // Mol. med. 2013. – Vol. 19. – P. 62–64.
  19. Shimasaki, J. Systemic involvement of high-mobility group box 1 protein and therapeutic effect of anti-high-mobility group box 1 protein antibody in a rat model of crush injury / J. Shimazaki [et al.] // Shock. – 2012. – Vol. 37. – № 6. – P. 34–638.

S.B. Onikienko, A.V. Zemlyanoi, V.I. Popov, Yu.I. Listopadov

### Heat shock protein-70 based protective agents against traumatic toxicosis as potent elicitors for tourniquet injury and severe blood loss

**Abstract.** Heat shock protein-70 based agents serve as potent protectors against the traumatic toxicosis and as elicitors for the severe blood loss and tourniquet injury in rats. Recombinant heat shock protein-70 and its long-acting derivatives – polyethylene glycol-ylated heat shock protein-70 and heat shock protein-70-Fc fusion protein dramatically increased the survival rates and inhibited the development of rhabdomyolysis, renal, hepatic injuries and systemic inflammation in traumatic toxicosis experimental model. Long-lasting muscle compression in rats induced leukocyte infiltration in muscles, kidneys and lungs with subsequent development of rhabdomyolysis, renal and lung injuries. Heat shock protein-70 and its derivatives inhibited traumatic toxicosis induced leukocyte infiltration and injuries of the target tissues. The most effective was the heat shock protein-70-Fc fusion protein. These agents dramatically increased the survival rate and survival time in experimental hemorrhagic shock. Survival time increasing strategy dramatically broadens the limits of «the golden hour» and rises the chances to take the injured persons to the special medical units and save their life. Heat shock protein-70 based agents are potent elicitors for tourniquet injury and severe blood loss, they can prevent the development of crush syndrome after long-lasting muscle compression injury, hemorrhagic shock after severe blood loss. These agents are promising for use during war and technical accidents and natural disasters.

**Key words:** muscle compression injury, severe blood loss, resistance, hemorrhagic shock, traumatic toxicosis, survival, renal injury, hepatic injury, systemic inflammatory response, heat shock protein-70, polyethylene glycol-ylated heat shock protein-70, heat shock protein-70-Fc fusion protein.

Контактный телефон: 292-33-44; +7-981-820-5990; e-mail: ylistopadov7@mail.ru