

Sepsis

Функциональная активность нейтрофилов при ожоговом сепсисе

И. В. Образцов¹, М. А. Годков², В. В. Кулабухов³,
Г. А. Владимирова⁴, Д. Ю. Измайлов⁴, Е. В. Проскурнина⁴

¹ Государственный научный центр колопроктологии им. А. Н. Рыжих Минздрава России,
Россия, 123423, г. Москва, ул. Салыма Адила, д. 2

² НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского,
Россия, 129090, г. Москва, Большая Сухаревская пл., д. 3

³ Институт хирургии им. А. В. Вишневского Минздрава России
Россия, 117997, г. Москва, ул. Большая Серпуховская, д. 27

⁴ Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Россия, 119192, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 31-5

Functional Activity of Neutrophils in Burn Sepsis

Igor V. Obraztsov¹, Mikhail A. Godkov², Vladimir V. Kulabukhov³, Galina A. Vladimirova⁴,
Dmitry Yu. Izmailov⁴, Elena V. Proskurnina⁴

¹ A. N. Ryzhykh State Scientific Center of Coloproctology, Russian Ministry of Health,
2 Salam Adil Str., Moscow 123423, Russia

² N. V. Sklifosovsky Research Institute of First Aid,
3 Bolshaya Sukharevskaya Square, Moscow 129090, Russia

³ A. V. Vishnevsky Institute of Surgery, Russian Ministry of Health,
27 Bolshaya Serpuhovskaya, Moscow 117997, Russia

⁴ Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University,
31-5 Lomonosovsky Avenue, Moscow 119192, Russia

Тенденция к развитию и генерализации инфекции у пациентов с тяжелой термической травмой реализуется за счет комплексного влияния термической травмы на иммунную систему. Особенно страдает фагоцитарная система, представленная, в первую очередь, нейтрофильными гранулоцитами.

Цель исследования: определение динамики изменения функциональной активности нейтрофилов у пациентов с термической травмой, а также ее прогностической значимости при развитии гнойно-септических осложнений ожоговой болезни.

Материалы и методы. Функциональную активность нейтрофилов оценивали на основе спонтанного и индуцированного хемилюминесцентного ответа цельной крови при последовательной стимуляции форбол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА) и N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином (фМЛФ). Было обследовано 34 пациента с ожоговой болезнью при разной тяжести течения ожоговой болезни и в динамике наблюдения.

Результаты. Разработанная новая методика была использована для исследования функциональной активности нейтрофилов при разной тяжести течения болезни и в динамике. В результате анализа хемилюминесцентных кривых развития респираторного взрыва нейтрофилов выявлены показатели, характеризующие состояние иммунной системы, а именно: одно- или двухфазный ответ на стимул, удельная активность нейтрофила «быстрой фазы», удельная активность нейтрофила «медленной фазы».

Заключение. Результаты позволили выделить тенденции изменения функциональной активности нейтрофилов при ожоговой болезни. Предложены диагностические и прогностические показатели функциональной активности нейтрофилов для оценки тяжести болезни и прогноза септического процесса.

Ключевые слова: хемилюминесценция; функциональная активность нейтрофилов; ожоговая травма; сепсис

A complex effect of thermal trauma on the immune system triggers the tendency to develop and generalize infection in patients with severe thermal trauma. The phagocytic system, which is represented, first of all, by neutrophilic granulocytes, is significantly altered.

Objective: to determine the dynamics of changes in the functional activity of neutrophils in patients with thermal trauma, as well as its prognostic significance in the development of purulent-septic complications of a burn disease.

Materials and methods. The functional activity of neutrophils was assessed by spontaneous and induced chemiluminescence responses of whole blood sequentially stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate

Адрес для корреспонденции:

Елена Проскурнина
E-mail: proskurnina@gmail.com

Correspondence to:

Elena Proskurnina
E-mail: proskurnina@gmail.com

(PMA) and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP). 34 patients with a burn disease of different severity were dynamically examined during observation.

Results. The newly developed technique was applied to study the responses of whole blood of patients with burn disease to stimuli; data on the functional activity of neutrophils depending on various severities of the disease and response dynamics were obtained. Analysis of chemiluminescent curves of the development of respiratory explosion of neutrophils helped to reveal parameters of the immune system state, namely: a one- or two-phase response to a stimulus, a «rapid phase» neutrophil specific activity, and a «slow phase» neutrophil specific activity.

Conclusion. The results revealed trends in alterations of functional activity of neutrophils in burn disease. Diagnostic and prognostic indices of the functional activity of neutrophils for assessing the severity of the disease and the prognosis of the septic process were suggested.

Key words: chemiluminescence, neutrophil functional activity; burn injury; sepsis

DOI:10.15360/1813-9779-2017-2-40-51

Введение

Проблема лечения ожоговой болезни и ее осложнений не теряет актуальности до настоящего времени [1]. В структуре летальности тяжелообожженных ведущее место занимает инфекция, приводящая к развитию пневмонии и сепсиса [2]. Развитие и генерализация инфекции у тяжелообожженных реализуется за счет влияния термической травмы на иммунную систему; в особенности страдает фагоцитарное звено иммунитета [3–5]. Дисфункция фагоцитов проявляется в нарушении уничтожения бактерий, изменении уровня секреции интерлейкинов и цитокинов макрофагами, активации и дегрануляции нейтрофилов с развитием окислительного стресса [6–8]. Описанные механизмы обуславливают системное повреждение тканей, приводящее к развитию полиорганной недостаточности и гибели пациента.

Поэтому оценка функции фагоцитарного звена иммунитета целесообразна на всех стадиях ожоговой болезни. При этом особую роль играет определение активности нейтрофилов как ключевых эффекторных клеток, ответственных за развитие воспаления и гнойно-септических осложнений при ожоговой болезни [1–3]. Выявление нейтрофильной дисфункции позволит своевременно прогнозировать течение ожоговой болезни и развитие гнойно-септических осложнений [9–11].

Существует целый ряд методик оценки бактерицидности нейтрофилов [12, 13]. Большинство из них или трудоемки, или субъективны, что исключает их использование в качестве скрининговых тестов при исследовании больших контингентов больных или пострадавших. В клинических экспериментальных исследованиях часто используется метод хемилюминесцентного (ХЛ) анализа нейтрофилов [14, 15]. Такой подход позволяет регистрировать клеточную активацию в процессе ее развития; он обладает высокой чувствительностью и исключает субъективный фактор работы оператора. Авторами ранее разработан новый подход ХЛ-анализа цельной крови, основанный на активации нейтрофилов последователь-

Introduction

Treating the burn disease and its complications remains a current task [1]. In the lethality structure of severely burnt, the major role belongs to an infection causing the development of sepsis and pneumonia [2]. Infection in severely burnt patients develops and generalizes thru the influence of thermal trauma on the immune system, particularly, to the phagocytic link of immunity suffers [3–5]. Dysfunction of phagocytes is manifested by damage and destruction of bacteria, changes in the level of secretion of interleukins and cytokines by macrophages, activation and degranulation of neutrophils followed by the development of oxidative stress [6–8]. The described mechanisms cause systemic tissue damage that results in the development of multi-organ failure and death of a patient.

Therefore, the phagocytic function of immunity should be assessed at all stages of the burn disease. It is particularly important to determine the activity of neutrophils as key effector cells responsible for developing inflammation and purulent-septic complications of burn disease [1–3]. The established neutrophilic dysfunction facilitates a timely prediction of the course of burn disease and development of purulent-septic complications [9–11].

There is a number of methods for evaluating bactericidal activity of neutrophils [12, 13]. Most of them are either laborious or subjective, which excludes their use as screening tests for the study of large populations of patients or victims. In clinical experimental studies, the method of chemiluminescent (CL) analysis of neutrophils is often applied [14, 15]. This approach allows recording cellular activation in during its development; it has a high sensitivity and excludes the subjective factor of the operator's work. The authors have developed a new approach for the whole blood CL analysis based on the activation of neutrophils by sequential application of two stimuli, phorbol-myristate acetate (PMA) and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), possessing different mechanisms of action [16]. This approach involves time-dependent registration of superoxide radical synthesis by neu-

ным внесением двух стимулов с различным механизмом действия: форбол-миристан-ацетата (ФМА) и N-формил-метионил-лейцил-фенилаланина (фМЛФ) [16]. Этот подход, использующий регистрацию синтеза супероксид-радикала нейтрофилами во времени (кинетическая ХЛ), позволил повысить информативность метода за счет новой количественной информации (удельной радикал-продуцирующей активности нейтрофила, общей радикальной активности нейтрофилов, показателей спонтанной активности, показателей стимулированной активности, коэффициента активации, коэффициента затухания), а также улучшить точность метода за счет повышения воспроизводимости при работе с одновременной регистрацией проб в 12-канальном приборе. В настоящей работе оценена клиническая значимость этого метода у пациентов с ожоговой травмой в зависимости от тяжести травмы, состояния и исхода, в том числе и для ранней диагностики гнойно-септических осложнений.

Материал и методы

В исследовании участвовали 34 пациента из отделений ожоговой реанимации НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского и Института хирургии им. А.В. Вишневского. Критерии включения: пациенты с ожогами пламенем, возраст менее 70 лет. Критерии исключения: возраст более 70 лет, онкологическая или гематологическая патология, туберкулез, ВИЧ-инфекция. Средний возраст обследованных составил 32,4 года при стандартном отклонении 11 лет (коэффициент вариации $V=35\%$), что характеризует группу как умеренно неоднородную по возрасту. Соотношение мужчины/женщины=10:7. Схема исследования приведена на рис. 1.

Суммарная площадь ожогов составила 10–54% (35,2% в среднем) поверхности тела, площадь глубоких ожогов – 0,5–40% (12% в среднем), индекс Франка (ИФ) – 10–130 (64,5 в среднем). Все пациенты получили стандартизованную терапию.

Планирование и организация эксперимента проводили в соответствии с требованиями надлежащей клинической практики. Определение минимального размера выборки проводили таким образом, чтобы в каждом случае обеспечить применимость объективных критериев статистической мощности и клинической правдоподобности исследования. Выборку реанимационных больных сформировали простым слепым методом (отсутствие субъективного влияния испытуемого на результаты исследования; объективно измеряемые приборами результаты лабораторных тестов). В данном случае значение простого слепого метода определяется тем, что результаты измерений ХЛ ответа являются объективно измеряемыми прибором объективными оценками, в отличие от качественных критериев исхода эксперимента (таких, например, как боль, выраженность отеков или качество жизни пациента), оценка которых проводится исследователем субъективно. Сроки обследования составили 1–2 сутки, 3–7 сутки, 8–15 сутки, 15+ сутки после травмы.

trophils (kinetic CL) that allowed to enhance the informative value of the results due to increased quantitative data (specific radical-producing neutrophil activity, total radical neutrophil activity, spontaneous activity, stimulated activity, activation coefficient, attenuation coefficient) and improved accuracy of the method due to increased reproducibility because of simultaneous recording of samples by a 12-channel instrument. In this study the clinical significance of this method has been evaluated in patients with burn injury, depending on the severity of the injury, condition and outcome.

Materials and Methods

The study included 34 patients from burn resuscitation departments of N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care and A.V. Vishnevsky Institute of Surgery. Inclusion criteria: patients with flame burns, less than 70 years age. Exclusion criteria: age over 70 years, presence of oncological or hematological diseases, tuberculosis, HIV infection. The average age of the examinees was 32.4 years with a standard deviation of 11 years (coefficient of variation $V=35\%$), which characterized the group as moderately heterogeneous in age. The ratio of male/female=10:7. The design of the study is shown in Fig. 1.

The total area of burns was 10–54% (35.2% on average) of the body surface, the area of deep burns was 0.5–40% (12% on average), the Frank index (FI) was 10–130 (64.5 on average). All patients received standard therapy.

The experiment was designed and arranged in compliance with the requirements of good clinical practice. The definition of the minimum sample size was performed so that in each case the applicability of objective criteria for statistical power and clinical validity of the study could be ensured. The sample of resuscitation patients was formed by a simple blind method (no subjective influence of the subject on the results of the study, laboratory tests that are objectively measured using instruments). In this case, the value of a simple blind method is determined by the fact that the results of measuring the CL response are objective evaluations objectively measurable using instruments, in contrast to qualitative criteria for the experiment outcome (for example, pain, severity of edema or quality of the patient's life). The terms of the examination were 1–2 days, 3–7 days, 8–15 days, and 15+ days after injury.

All subjects were divided into groups according to the severity of the thermal injury according to the Frank Index and by gender (Table 1). Diagnosis of burn shock was performed based on the values of the shock index adjusted for age [17]; shock was observed in all patients with $FI>70$. The systemic inflammatory response syndrome (SIRS) was clinically determined according to the criteria [18]; the dynamic assessment of multiple organ failure was performed using the SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) scale. SIRS developed in 18 patients, whereas diagnosis of sepsis was established in six of those patients based on an increase in the SOFA value by 2 or more associated with a persistent infection [16].

The following reagents were used in the chemiluminescent analysis: luminol (Sigma-Aldrich); Hanks solution with glucose without dye (Chumakov Polymyelitis and

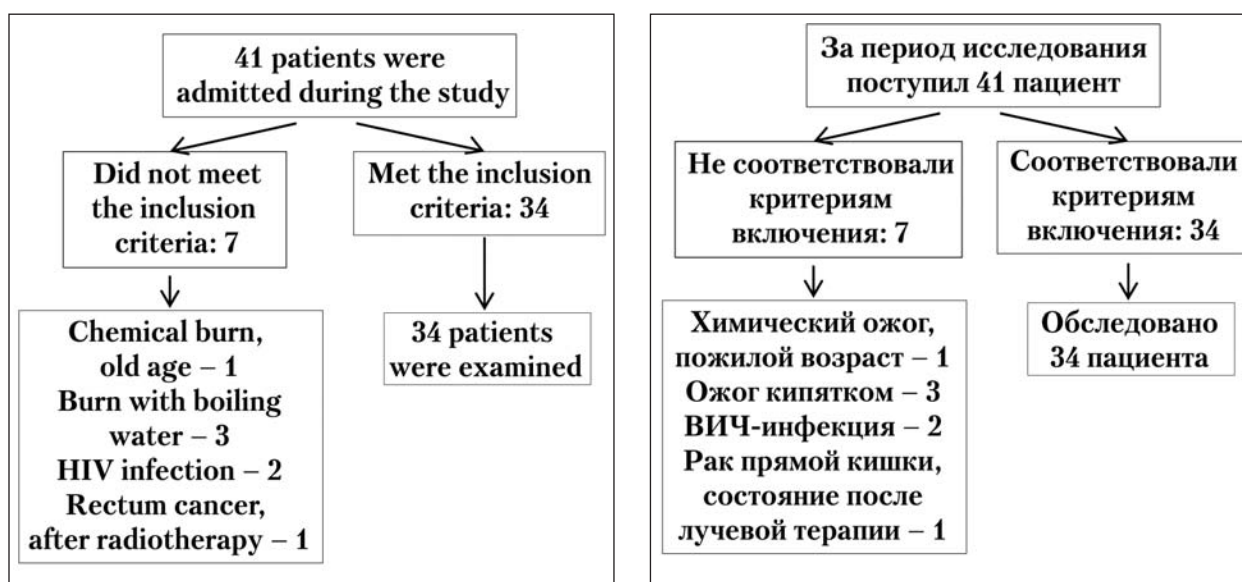


Fig. 1. The scheme of the patients' inclusion in the study.

Рис. 1. Схема включения больных в исследование.

Таблица 1. Обследованные пациенты с термической травмой.

Table 1. Examined patients with thermal trauma.

Patients	Frank Index		Total (n=34)
	< 70	> 70	
Men	12	8	20
Women	6	8	14

Примечание. Для табл. 1, 3: Patients – больные; Women – женщины; Men – мужчины; Frank Index (FI) – индекс Франка (ИФ); Total – всего.

Совокупность обследованных разделили на группы в соответствии с тяжестью термической травмы по индексу Франка и по гендерному признаку (табл. 1). Диагностику ожогового шока провели на основании значений шокового индекса с поправкой на возраст [17]; шок наблюдали у всех пациентов с ИФ > 70. Клинически определяли синдром системного воспалительного ответа (ССВО) согласно критериям [18]; динамическую оценку полиорганной недостаточности (ПОН) выполнили по шкале SOFA (Sequential Organ Failure Assessment). При этом ССВО развился у 18 пациентов, среди которых диагноз «сепсис» был установлен у 6 больных на основании увеличения значения SOFA на 2 и более при персистирующем очаге инфекции [16].

Для проведения хемилюминесцентного анализа использовали следующие реактивы: люминол (Sigma-Aldrich); раствор Хенкса с глюкозой без красителя (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН), стабилизированный 2 мМ HEPES; N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (фМЛФ), форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) (все Sigma-Aldrich).

Хемилюминесцентная методика оценки функциональной активности нейтрофилов [16]: Оценку функциональной активности нейтрофилов проводили в соответствии с разработанным ранее подходом, основанным на двухстадийной стимуляции нейтрофилов при последовательном внесении ФМА и фМЛФ.

Во всех опытах взятие 5 мл крови осуществляли из кубитальной вены в вакутейнеры с гепарином (конеч-

Viral Encephalitis Institute, RAMS), stabilized with 2 mM HEPES; N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF), phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (all Sigma-Aldrich).

Chemiluminescent method for assessing the functional activity of neutrophils [16]: the functional activity of neutrophils was evaluated following the previously developed approach that included two-stage stimulation of neutrophils with the sequential application of PMA and fMLF.

Briefly, in all the experiments, 5 ml of blood was taken from the cubital vein to the vacuainers with heparin (the final concentration of heparin was 5 U/ml). The blood samples were stored for up to two hours before analysis. 450 ml of medium, 25 ml of 1 mM luminol solution (final concentration $c_l=45$ mM), and 25 ml of whole blood were injected into the chemiluminometer cuvette and spontaneous chemiluminescence was recorded for 10 minutes. 50 ml of 0.5 mg/ml PMA ($c_{PMA}=0.081$ nM) was added. After 20 minutes of incubation 55 ml of 100 mg/ml fMLP ($c_{fMLP}=10$ nM) was administered and the CL response was recorded for at least 60 minutes.

The form of kinetic curves and analytical index (the amplitude of the CL signal after stimulation of PMA + fMLF (Fig. 1) normalized by the number of neutrophils were studied. The data were compared with clinical observations and laboratory results.

Statistical processing of the data and graphical representation of the results was performed by standard software products, Excel packages with StatPad application (Microsoft, USA) and STATISTICA (StatSoft, USA).

ная концентрация гепарина — 5 ЕД/мл). Образцы крови пациентов хранили до анализа не более двух часов.

В кювету хемилиуминометра вносили 450 мкл среды, 25 мкл 1 мМ раствора люминола (конечная концентрация $c_{\text{л}}=45$ мкМ), 25 мкл цельной крови и регистрировали спонтанную хемилиуминесценцию в течение 10 минут. Добавляли 50 мкл 0,5 мкг/мл ФМА ($c_{\text{ФМА}}=0,081$ нМ). После 20 минут инкубации вводили 55 мкл 100 мкМ фМЛФ ($c_{\text{фМЛФ}}=10$ мкМ) и регистрировали ХЛ-ответ в течение не менее 60 минут.

Изучали форму кинетических кривых и аналитический показатель — амплитуду ХЛ-сигнала после стимуляции ФМА+фМЛФ (рис. 1), нормированную на количество нейтрофилов. Данные сопоставляли с клиническими наблюдениями и результатами лабораторных исследований.

Для статистической обработки данных и графического представления результатов использовали стандартные программные продукты: пакеты Excel (с приложением StatPad) (Microsoft, США) и STATISTICA (StatSoft, США). Для определения однородности изучаемых показателей анализировали полученные величины по отношению к нормальному ожидаемому распределению с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения групп использовали параметрические (с помощью *t*-критерия Стьюдента) и непараметрические (с помощью критерия Манна-Уитни) методы статистической обработки. Результаты исследования для переменных с нормальным распределением представлены в формате $M \pm \sigma$ (M — средняя арифметическая, σ — стандартное отклонение). Для переменных с иным распределением указаны медиана и интерквартильный размах. Критическое значение уровня значимости p принималось равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Для оценки функциональной активности нейтрофилов у пациентов с ожоговой болезнью была применена разработанная нами ХЛ-методика с двухстадийной стимуляцией нейтрофилов, при помощи которой ранее было обследовано 90 практически здоровых доноров. Во всех случаях для доноров получали единообразные кинетические кривые развития ХЛ, аналогичные кривой на рис. 1, а. После предстимуляции ФМА и введения фМЛФ наблюдали резкий рост свечения, который можно назвать «быстрой» вспышкой. Для количественного описания развития ФМА+фМЛФ-стимулированной ХЛ рассчитывали нормированную амплитуду сигнала быстрой вспышки $A_{\text{фМЛФ}}^*$ (максимальная интенсивность, деленная на число нейтрофилов). Референсный интервал для этого показателя приведен в табл. 2.

При обследовании больных наблюдали три варианта развития ХЛ-кривой. У пациентов с легкими неосложненными ожогами или на этапе реконвалесценции кинетика развития ХЛ соответствовала профилям, полученным от здоровых доноров (рис. 1, а). Однако в осложненных и тяжелых случаях наблюдали развитие кинетики

Normality of distribution of variables were analyzed by Shapiro-Wilk test. To compare the groups, parametric (Student's *t*-test) and non-parametric (Mann-Whitney test) were used. For variables with normal distribution data were calculated as $M \pm \sigma$ (M is the arithmetic mean, σ is the standard deviation). For variables with a different distribution, the median and the interquartile range were calculated. The critical value of P to determine significance between groups was 0.05.

Results and Discussion

To assess the functional activity of neutrophils in patients with burn disease we applied the developed CL method with two-stage neutrophil stimulation, which was previously used to examine 90 practically healthy donors. In all cases uniform kinetic curves for the development of CL were obtained for the donors (analogous to the curve in Fig. 1, a). After the pre-stimulation of PMA and the introduction of fMLP a sharp increase in luminescence was observed that can be called a «rapid» flash. To provide a quantitative description of the development of PMA + fMLF-stimulated CL, the normalized amplitude of the rapid flash signal A_{fMLF}^* (the maximum intensity divided by the number of neutrophils) was calculated. The reference interval for this indicator is presented in Table 2.

Three ways of developing the CL-curve were observed when examining the patients. In patients with mild uncomplicated burns or at the stage of convalescence, the kinetics of CL development corresponded to the profiles obtained from healthy donors (Fig. 1, a). However, in complicated and severe cases the development of kinetics of another type was observed: after a «rapid» flash an additional intense «slow» flash occurred (Fig. 2, a). In some cases, the intensity of the «slow» flash of CL was so high that it made it impossible to determine the amplitude of the «rapid» flash (Fig. 2, c).

The development of a «slow» flash of CL in burnt patients was recorded in only 20 of 34 patients (60%). In patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and persistent infection slow kinetics was recorded in 14 of 18 (80%), in patients without SIRS — in 6 of 16 (38%). In general, in half of men with $FI < 70$ the slow kinetics of the CL response was identified starting from the 3rd day of the disease and it reached the highest amplitude values on the 3rd–7th day after the trauma. In women with $FI < 70$, the slow kinetics was not determined. In the group of severely burnt men and women with $FI > 70$ the slow kinetics of the CL response was recorded in all patients starting from Day 3 of the disease, and in some patients from Day 1 (Table 3).

The normalized amplitudes of the rapid and slow responses to fMLF ($A_{\text{fMLF-b}}^*$ and $A_{\text{fMLF-m}}^*$) were calculated for the examined patients. For men and women with an $FI < 70$ the normalized amplitude of

Таблица 2. Статистические данные показателя $A^*_{\text{фМЛФ}}$, характеризующего функциональную активность нейтрофилов ($n=90$).**Table 2. The statistical data of the A^*_{fMLF} index characterizing the functional activity of neutrophils ($n=90$).**

Index	Median value	Interquartile range	Reference interval (2.5–97.5, percentile)
$A^*_{\text{fMLP}}, \text{V/cell}$	$4.13 \cdot 10^{-5}$	$2.31 \cdot 10^{-5} - 5.95 \cdot 10^{-5}$	$0.70 \cdot 10^{-5} - 14.20 \cdot 10^{-5}$

Примечание. Для табл. 2, 3: $A^*_{\text{fMLP}}, \text{V/cell}$ – $A^*_{\text{фМЛФ}}, \text{В/кл}$; Index – показатель; Median – медиана; Interquartile range – интерквартильный размах; Reference interval – референсный интервал; percentile – процентиля.

Таблица 3. Показатели функциональной активности нейтрофилов у пациентов с ожоговой травмой.**Table 3. Indicators of the functional activity of neutrophils in patients with burn injury.**

Index	Values of index at the day of study			
	1st–2nd	3d–7th	8–15th	15th+ days
Men, FI<70, n=12				
$A^*_{\text{fMLP}}, \text{V/cell}$	Decreased in 2 patients	Within RI	Within RI	Within RI
SF	0	6	6	6
Men, FI>70, n=8				
$A^*_{\text{fMLP}}, \text{V/cell}$	Decreased in 4 patients	Decreased in 2 patients	Within RI	Within RI
SF	2	6	8	8
Women, FI<70, n=8				
$A^*_{\text{fMLP}}, \text{V/cell}$	Within RI	Within RI	Within RI	Within RI
SF	0	0	0	0
Women, FI>70, n=6				
$A^*_{\text{fMLP}}, \text{V/cell}$	Decreased in 4 patients	Decreased in 2 patients	Within RI	Within RI
SF	2	6	6	6

Note. RI – Reference Interval; SF – «Slow» Flash.

Примечание. Values of index at the day of study – значения показателя по суткам исследования; Decreased – снижен; Within – в пределах; RI – референсный интервал; SF – «медленная» вспышка.

другого типа – после «быстрой» вспышки возникла дополнительная интенсивная «медленная» вспышка (рис. 2, а). В некоторых случаях интенсивность «медленной» вспышки ХЛ была настолько высокой, что делала невозможным определение значения амплитуды «быстрой» вспышки (рис. 2, в).

Развитие «медленной» вспышки ХЛ у обожженных зафиксировали всего в 20 наблюдениях из 34 (60%). При этом у больных с синдромом системного воспалительного ответа (ССВО) при персистирующем очаге инфекции медленная кинетика была зарегистрирована в 14 наблюдениях из 18 (80%), у больных без ССВО – в 6 из 16 (38%). В целом, у половины мужчин с ИФ<70 медленная кинетика ХЛ-ответа определялась, начиная с 3-х суток заболевания, и достигала наивысших значений амплитуды на 3–7 сутки после травмы. У женщин с ИФ<70 медленная кинетика не определялась. В группе тяжело обожженных мужчин и женщин с ИФ>70 медленная кинетика ХЛ-ответа была зарегистрирована у всех пациентов, начиная с 3-х суток заболевания, а у некоторых пациентов и с 1-х суток (табл. 3).

Рассчитаны нормированные амплитуды быстрого и медленного ответа на фМЛФ ($A^*_{\text{фМЛФ-б}}$ и $A^*_{\text{фМЛФ-м}}$) у обследованных обожженных. Для мужчин и женщин с ИФ<70 нормированная амплитуда быстрого ответа $A^*_{\text{фМЛФ-б}}$ находится в пределах референсного интервала, для мужчин и женщин с

the rapid response of $A^*_{\text{fMLF-б}}$ was within the reference interval, for men and women with FI>70 in several cases in the first 7 days of the disease this index decreased and then returned to normal (Table 3).

The mean values of the normalized amplitude of the slow flash ($A^*_{\text{fMLF-м}}$) were as follows: $1.02 \cdot 10^{-5}$ W/Cl for patients with sepsis and $0.85 \cdot 10^{-5}$ W/Cl for patients without sepsis; the differences were statistically significant by the nonparametric Mann-Whitney test ($U=236, z=5.7, P<0.001$).

The analysis of normalized amplitudes of rapid and slow response ($A^*_{\text{fMLF-б}}$ and $A^*_{\text{fMLF-м}}$) was performed depending on the number of neutrophils in the blood of patients. The nature of the connection between $A^*_{\text{fMLF-б}}$ and the neutrophil count in burnt people corresponded to that of healthy donors: with an increase in the neutrophil count from 2 to 10 million/ml, the normalized amplitude of the rapid CL response («specific» activity of the «rapid» neutrophil) remained constant.

The correlation field for $A^*_{\text{fMLF-м}}$ and the neutrophil count in the blood of the examined patients is shown in Fig. 2. The main part of the points of individual observations forms a cloud with low entropy modeled by linear dependence ($R^2=70.28\%$). All outlier values were those determined in patients with sepsis (total of six people, two of whom died). Pearson correlation of A^*_{fMLF} and the neutrophil count in the blood of the examined patients was +0.84, demonstrating a trend to be statistically sig-

Sepsis

ИФ>70 в нескольких случаях в первые 7 дней болезни этот показатель снижен, а потом приходит в норму (табл. 3).

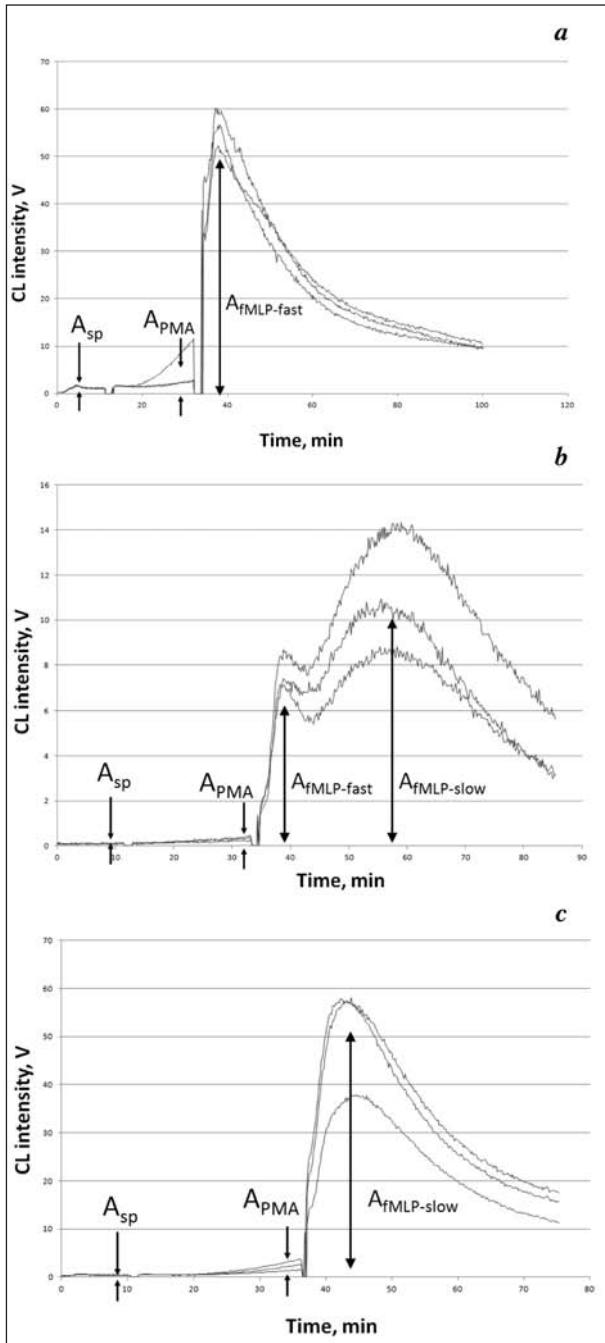


Рис. 2. Хемилуминограммы крови пациентов с ожоговой травмой при двойной последовательной стимуляции.

Fig. 2. Chemiluminograms of blood of patients with burn injury with double consecutive stimulation.

Note. A_{sp} – the amplitude of the spontaneous CL response; A_{PMA} – the amplitude of the response induced by PMA (priming); A_{fMLP} – the amplitude of the rapid response induced by fMLP after priming. *a* – the «rapid» kinetics prevails (flame burn 2–3AB at 50%, 3B – 40%, Day 3 of the disease); *b* – both «rapid» and «slow» kinetics of neutrophils are expressed (flame burn 2–3AB at 40%, 3B – 20%, Day 21 of the disease); *c* – the «slow» kinetics of CL-response of neutrophils prevails (flame burn 2–3AB at 25%, 3B – 10%, Day 5 of disease).

Примечание. Cl intensity, V – интенсивность ХЛ; Time, min – время, мин; fast – быстрая; slow – медленная (также для рис. 3). A_{sp} – амплитуда спонтанного ХЛ ответа; A_{PMA} – амплитуда ответа, индуцированного ФМА; A_{fMLP} – амплитуда ответа, индуцированного фМЛФ после прайминга. *a* – превалирует «быстрая» кинетика (ожог пламенем 2–3АБ ст. 50%, 3Б – 40%, 3-е сутки заболевания); *b* – выражена как «быстрая», так и «медленная» кинетика нейтрофилов (ожог пламенем 2–3АБ ст. 40%, 3Б – 20%, 21-е сутки заболевания); *c* – превалирует «медленная» кинетика ХЛ-ответа нейтрофилов (ожог пламенем 2–3АБ ст. 25%, 3Б – 10%, 5-е сутки заболевания).

nificant ($\alpha=0.1\%$). In other words, the «specific» activity of the «slow» neutrophil almost linearly grows with the increase in the number of neutrophils in patients without the diagnosis of sepsis by the criteria of *Sepsis-3*.

Comparison of CL data with other immunological parameters in burnt patients demonstrated significant decrease in the number of T-lymphocytes. The level of a decrease in most observations depended on the severity of the injury, severity of toxemia, and burn infection. In a favorable disease course, the absolute numbers of T-cells were restored. The content of B-lymphocytes in the examined patients was within the limits of normal values or was reduced. All subjects had a significant increase in the total CEC content at all stages of the disease. This excess was due to an increase in the number of medium and small-sized CECs; the number of large CECs, to the contrary, was reduced or was within the range of normal values. The increase in the content of large CECs was observed only in three of the examined patients. Statistical analysis (Pearson correlation coefficient) showed no association between studied immunological parameters and neutrophil CL response index.

The observed deviations of the CL-response in burnt patients are confirmed by literature data on a serious dysfunction of phagocytosis in patients with burn disease. A significant increase in the non-standardized amplitude indices at various stages of the analysis was due to a massive release of neutrophils from the bone marrow into the bloodstream due to burn toxemia and septicotoxemia. It is indicative of an increase in the overall level of production of reactive oxygen species (ROS) by blood stream cells. Therefore, experimental data are in agreement with the published data on the induction of severe oxidative stress in patients with thermal trauma that contribute to systemic disturbances of homeostasis and organ dysfunction [1, 17].

On the other hand, the registered cases of normalized indices of CL-grams of burnt patients within the limits of the reference interval or below the norm indicate the presence of normergic and even hypoergic oxidative metabolism of neutrophils. This

Средние значения нормированной амплитуды медленной вспышки ($A^*_{\text{фмлф-м}}$) составили $1,02 \cdot 10^{-5}$ В/кл для септических пациентов и $0,85 \cdot 10^{-5}$ В/кл для пациентов без сепсиса; различия статистически значимы по непараметрическому критерию Манна-Уитни ($U=236$, $z=5,7$, $p<0,001$).

Провели анализ нормированных амплитуд быстрого и медленного ответа ($A^*_{\text{фмлф-б}}$ и $A^*_{\text{фмлф-м}}$) в зависимости от числа нейтрофилов в крови больных. Характер связи между $A^*_{\text{фмлф-б}}$ и содержанием нейтрофилов у обожженных соответствует таковому у здоровых доноров: при увеличении содержания нейтрофилов с 2 до 10 млн/мл нормированная амплитуда быстрого ХЛ-ответа («удельная» активность «быстрого» нейтрофила) остается постоянной.

Поле корреляции $A^*_{\text{фмлф-м}}$ и содержания нейтрофилов в крови обследованных больных представлено на рис. 2. Основная часть точек индивидуальных наблюдений формирует облако с низкой энтропией, моделируемое линейной зависимостью ($R^2=70,28\%$). Все выделяющиеся наблюдения представляют собой измерения у пациентов с диагностированным сепсисом (всего шесть человек, из них двое умерли). После удаления данных пациентов, находящихся в нестабильном состоянии, коэффициент корреляции по Пирсону между $A^*_{\text{фмлф-м}}$ и содержанием нейтрофилов в крови обследованных больных составил 0,84 — это свидетельствует о тесной статистически значимой ($\alpha=0,1\%$) положительной связи. Иными словами, «удельная» активность «медленного» нейтрофила практически линейно увеличивается с увеличением числа нейтрофилов у пациентов без диагноза сепсис по критериям *Сепсис-3*.

Было проведено сравнение ХЛ-данных с другими иммунологическими показателями. У обследованных обожженных определялось значительное снижение количества Т-лимфоцитов, причем степень снижения в большинстве наблюдений зависела от тяжести травмы, выраженности токсемии и ожоговой инфекции. При благоприятном течении заболевания наблюдали восстановление абсолютных показателей Т-клеточного ответа. Содержание В-лимфоцитов у обследованных обожженных находилось в пределах нормальных значений или было снижено. У всех обследованных наблюдали значительное повышение общего содержания ЦИК на всех стадиях заболевания. Это превышение было обусловлено увеличением численности ЦИК среднего и малого размера; численность больших ЦИК, напротив, была снижена или находилась в пределах диапазона нормальных значений. Увеличение содержания больших ЦИК наблюдали только у трех из обследованных пациентов. Статистический анализ (коэффициент корреляции по Пирсону) показал отсутствие связи между этими иммуноло-

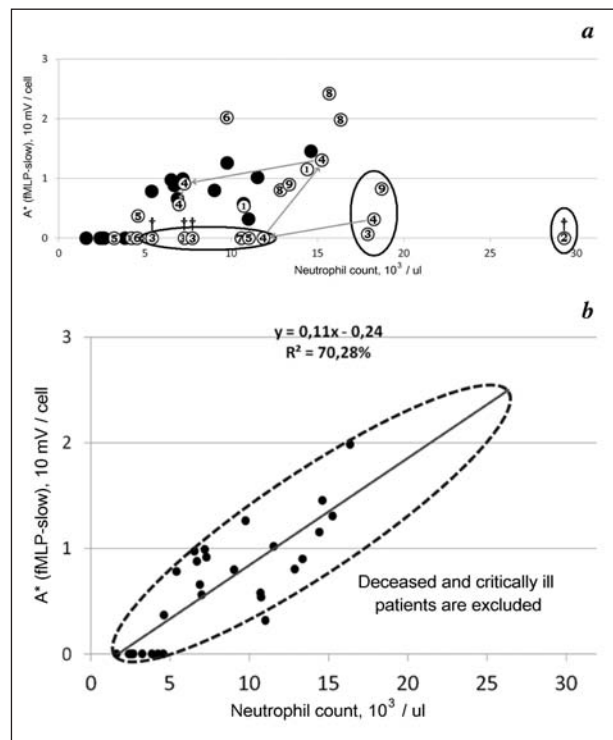


Рис. 3. Поле корреляции между $A^*_{\text{фмлф-м}}$ и содержанием нейтрофилов.

Fig. 3. The correlation field between $A^*_{\text{fmph-m}}$ and the content of neutrophils.

Note. *a* — all observations; ○ — observations of patients who stayed in the hospital for a long time because of the development of serious purulent-septic complications; the number marks the observations received of one of the subjects during the dynamic observation; the arrows mark the dynamics of the indices of patient number. 4 (Day 3, Day 7, Day 14, Day 27); † — observations of deceased patients, patient number 3 died on Day 19 of the disease, patient number 2 — on Day 7; ● — observations of patients in a stable state. Outstanding observations are circled. *b* — outstanding observations are removed, linear regression, its equation and coefficient of determination are shown.

Примечание. Neutrophil count — количество нейтрофилов; Deceased and critically ill patients are excluded — без умерших и пациентов в критическом состоянии. *a* — все наблюдения; ○ — наблюдения больных, длительно пребывавших в стационаре в связи с развитием серьезных гнойно-септических осложнений; номер маркирует наблюдения, полученные от одного из обследуемых в процессе динамического наблюдения; стрелки отмечают динамику показателей пациентки №4 (3-и; 7-е; 14-е; 19-е; 27-е сутки); † — наблюдения, полученные от умерших пациентов, больной №3 скончался на 19-е сутки заболевания, больная №2 — на 7-е; ● — наблюдения, полученные от пациентов в стабильном состоянии. Выделяющиеся наблюдения обведены. *b* — элиминированы выделяющиеся наблюдения, показана линейная регрессия, ее уравнение и коэффициент детерминации.

data is consistent with the concept of the most active neutrophils migrating to an inflammatory focus if there is a less active population in the systemic circulation [20]. Given the above, it can be assumed that oxidative stress in burn disease is characterized by an increase in the absolute amount of neutrophils in the bloodstream as a substrate for the synthesis of ROS in the absence of a qualitative enhancement of

гическими показателями и показателем ХЛ-ответа нейтрофилов.

Наблюдаемые отклонения показателей ХЛ-ответа у обожженных подтверждают литературные данные о серьезной дисфункции фагоцитарного звена при ожоговой болезни. Значительное увеличение ненормированных показателей амплитуды на различных этапах анализа обусловлено массивным выходом нейтрофилов из костного мозга в кровяное русло на фоне ожоговой токсемии и септикотоксемии и свидетельствует об увеличении общего уровня продукции активных форм кислорода (АФК) клетками, находящимися в системном кровотоке. Таким образом, экспериментальные данные подтверждают данные литературных источников о наличии тяжелого окислительного стресса у пациентов с термической травмой, способствующего системным нарушениям гомеостаза и органной дисфункции [1, 17].

С другой стороны, зарегистрированные случаи нормированных показателей ХЛ-грамм обожженных в границах референтного интервала или ниже нормы свидетельствуют о наличии нормэргического и даже гипоэргического окислительного метаболизма нейтрофилов. Эти данные согласуются с представлением о миграции наиболее активных нейтрофилов в очаг воспаления при наличии менее активной популяции в системном кровотоке [20]. Учитывая вышеизложенное, можно предположить, что окислительный стресс при ожоговой болезни характеризуется увеличением абсолютного количества нейтрофилов в кровотоке как субстрата синтеза АФК при отсутствии качественного усиления их окислительного метаболизма. Такой вывод подтверждает представления о нарушении функции нейтрофила и иммуносупрессии при ожоговой болезни [21].

Отдельного рассмотрения требует кинетика медленного ответа на фМЛФ и ее биологический смысл. По нашим данным, появление медленного ответа на фМЛФ не типично для практически здоровых людей. Наличие активного воспалительного процесса при развитии ожоговой токсемии или септикотоксемии индуцирует появление медленного ответа на фМЛФ на ХЛ-грамме, причем при благоприятном исходе заболевания даже на фоне ССВО интенсивность медленного ХЛ-ответа в сильной степени коррелирует с содержанием нейтрофилов в крови пациентов. С другой стороны, наличие сепсиса и прогрессирующей ПОН у шести пациентов оказалось ассоциировано с ослаблением медленного ответа на фМЛФ, вплоть до полного его отсутствия у погибших больных. Это наблюдение дает основание предположить, что медленная кинетика ХЛ реализуется благодаря выходу в системный кровоток субпопуляции нейтрофилов, обладающих повышенной функциональной активностью. По данным некоторых авторов [20, 21]

their oxidative metabolism. This conclusion confirms the idea of a violation of neutrophil function and immunosuppression in case of burn disease [21].

The kinetics of a slow response to fMLF and its biological meaning should also be considered. According to our data, the slow response to fMLF is not typical for healthy people. An active inflammatory process with the development of burn toxemia or septicotoxemia induces a slow response to fMLF on CL-gram, and with a favorable outcome of the disease and even with the SIRS, the intensity of a slow CL-response strongly correlates with the neutrophil count in patients' blood. On the other hand, sepsis and progressing multiple organ dysfunction syndrome in six patients were associated with a weakening of a slow response to fMLF, up to its complete absence in patients prior to death. This observation suggests that the slow kinetics of CL is due to the release into the systemic bloodstream of a subpopulation of neutrophils with increased functional activity. According to published data [20, 21], a slow CL response to the introduction of fMLF is formed due to the activation of phagocytosis and intracellular ROS production. Therefore, the high intensity of a slow flash can be interpreted as a sign of effective intracellular destruction of bacteria. The normergic response of the organism to burn toxemia and septicotoxemia followed by reconvalescence is fulfilled due to a subpopulation of neutrophils with high activity of intracellular bacterial killing.

An increase in the level of CRP, the acute phase protein, starts in the blood 4 hours after tissue damage and reaches a maximum in 24–72 hours. The absence of slow kinetics in the early stages of the disease with an extremely high level of CRP indicates an anergic response of cellular immunity with a high activity of the inflammatory response and an extremely unfavorable prognosis for the development of sepsis. This model of response was observed in four patients included in the study: two of them died (on Days 7 and 19), two stayed in the intensive care unit for more than 30 days due to the development of complications (abscessed pneumonia).

Patients with insufficient intensity of slow kinetics generally experienced a severe long-term course of the disease with two cases of a fatal outcome. This observation can be explained by the absence of functionally active neutrophils in such patients, with an increase in the number of neutrophils in the bloodstream only through functionally inferior forms with predominantly extracellular ROS. Functionally inferior neutrophils are unable to effectively kill pathogenic microorganisms inside the phagosome. In our opinion, the described deficiency of neutrophil function provides a pathogenetic basis of the complicated course of the disease with the development of purulent-septic complications. It should be noted that the normalized amplitude of the

медленный ХЛ-ответ на внесение ФМЛФ формируется за счет активации фагоцитоза и внутриклеточной наработки АФК. Таким образом, высокую интенсивность медленной вспышки можно интерпретировать, как признак эффективного внутриклеточного уничтожения бактерий. Именно благодаря субпопуляции нейтрофилов с высокой активностью внутриклеточного бактериального киллинга реализуется нормэргический ответ организма на ожоговую токсемию и септикотоксемию с последующей реконвалесценцией.

Повышение уровня СРБ, белка острой фазы, в крови начинается через 4 часа после тканевого повреждения, достигает максимума через 24–72 часа. Отсутствие медленной кинетики на ранних сроках заболевания при крайне высоком уровне СРБ свидетельствует об анергическом ответе клеточного иммунитета при высокой активности воспалительного ответа и крайне неблагоприятном прогнозе развития сепсиса. Такую модель ответа наблюдали у четырех пациентов, включенных в исследование: двое из них скончались (на 7 и 19 сутки заболевания), двое пребывали в реанимационном отделении более 30 дней из-за развившихся осложнений (абсцедирующая пневмония).

В целом, у пациентов с недостаточной интенсивностью медленной кинетики отмечали тяжелое длительное течение заболевания; в двух случаях с летальным исходом. Это наблюдение можно объяснить отсутствием у таких пациентов функционально активных нейтрофилов, при увеличении численности нейтрофилов в кровотоке только за счет функционально неполноценных форм с преимущественно внеклеточной наработкой АФК. Функционально неполноценные нейтрофилы неспособны эффективно уничтожать патогенные микроорганизмы внутри фагосом. Описанный дефицит функции нейтрофилов, по нашему мнению, является патогенетической основой осложненного течения заболевания с развитием гнойно-септических осложнений. Примечательно, что нормированная амплитуда медленного ответа на фМЛФ сигнализирует о нарушениях функции нейтрофилов уже в первые трое суток заболевания, следовательно, этот маркер может быть перспективен в качестве раннего предиктора течения ожоговой болезни. Таким образом, обнаруженная зависимость интенсивности медленной кинетики от содержания нейтрофилов характеризует оптимальный (нормэргический) вариант ответа организма на внедрение инфекции при ожоговой болезни, который может служить индикатором благоприятного прогноза.

Заключение

Применение подхода, основанного на двухстадийной стимуляции нейтрофилов, позволило

slow response to fMLF signals violations of neutrophil function already in the first three days of the disease, therefore, this pattern can serve as a promising candidate biomarker for early predicting the course of burn disease. Therefore, the observed dependence of the intensity of slow kinetics on neutrophil counts features the optimal (normal) variant of the organism's response to the infection in a burn disease, which can serve as an indicator of a favorable prognosis.

Conclusion

The use of developed method of two-stage stimulation of neutrophils made it possible to significantly improve the CL analysis. The increased signaling contributed to more enhanced sensitivity of the method. In addition, the priming effect of PMA on neutrophils promoted standardization of the kinetics of the CL response to the main secondary stimulus (fMLF). As a result, a system of standard indicators for the evaluation of the functional activity of neutrophils in burn patients was proposed.

The developed method enabled new information on the generation of active forms of oxygen by neutrophils in burn disease. In a number of cases, a second phase («slow» flash) occurs after the first phase of a respiratory explosion («rapid» flash). A slow flash can be explained either by the variety in populations of neutrophils («rapid» and «slow» neutrophils), or by two different processes of ROS production in one population (extracellular and intracellular).

A «slow» flash of CL-response is typical for patients with severe thermal trauma (from the first day of the disease). The intensity of the normalized amplitude of a «slow» flash with a normergic response of the body is directly proportional to the number of neutrophils. A low intensity of slow kinetics with a low content of neutrophils is typical for patients with an easier progression of burn disease. High intensity of slow kinetics at a high content indicates a favorable prognosis for the development of burn disease in severe patients. With a high content of neutrophils, the insufficient intensity of slow kinetics enables a prediction of a severe long-term course of the disease with a likely lethal outcome and purulent-septic complications.

Thus, it can be argued that the proposed technique is promising laboratory method for evaluating the functional activity of neutrophils. It can provide valuable information in terms of the prognosis of development and severity of purulent-septic complications in patients. It can also be applied to obtain early indicators of the treatment efficacy. In the long term, it seems advisable to increase the number of subjects and also to test the technique on patients with sepsis of various etiologies.

значительно улучшить аналитические характеристики ХЛ-анализа. Так, усиление интенсивности сигнала способствовало повышению разрешающей способности метода и, как следствие, его чувствительности; кроме того, эффект прайминга нейтрофилов ФМА способствовал стандартизации кинетики ХЛ-ответа на основной стимул (фМЛФ). В результате предложена система стандартных показателей для оценки функциональной активности нейтрофилов у ожоговых больных.

Разработанный метод позволил получить новую информацию о продукции активных форм кислорода нейтрофилами при ожоговой болезни, а именно, в ряде случаев после первой фазы респираторного взрыва («быстрая» вспышка) происходит вторая фаза («медленная» вспышка). Медленная вспышка может быть объяснена либо наличием разных популяций нейтрофилов («быстрые» и «медленные» нейтрофилы), либо двумя разными процессами продукции АФК в одной популяции — внеклеточного и внутриклеточного.

Появление «медленной» вспышки ХЛ-ответа характерно для больных с тяжелой термической травмой, причем с первых суток заболевания. Интенсивность нормированной амплитуды «медленной» вспышки при нормэргическом ответе организма прямо пропорциональна количеству нейтрофилов. Низкая интенсивность медленной кинетики при низком содержании нейтрофилов характерна для больных с более легким течением ожоговой болезни. Высокая интенсивность медленной кинетики при высоком содержании свидетельствует о благоприятном прогнозе развития ожоговой болезни у тяжелых больных. При высоком содержании нейтрофилов недостаточная интенсивность медленной кинетики позволяет прогнозировать тяжелое длительное течение заболевания с вероятностью летального исхода и гнойно-септическими осложнениями.

Литература

1. Алексеев А.А., Крутиков М.Г., Яковлев В.П. Ожоговая инфекция: этиология, патогенез, диагностика, профилактика и лечение. М.: Вузовская книга; 2010: 416.
2. Ronat J.B., Kakol J., Khoury M.N., Berthelot M., Yun O., Brown V., Murphy R.A. Highly drug-resistant pathogens implicated in burn-associated bacteremia in an iraqi burn care unit. *PLoS One*. 2014; 9 (8): e101017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101017>. PMID: 25111170
3. Calum H., Moser C., Jensen P.Ø., Christophersen L., Maling D.S., van Gennip M., Bjarnsholt T., Hougen H.P., Givskov M., Jacobsen G.K., Hoiby N. Thermal injury induces impaired function in polymorphonuclear neutrophil granulocytes and reduced control of burn wound infection. *Clin. Exp. Immunol.* 2009; 156 (1): 102–110. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03861.x>. PMID: 19210518
4. Crimi E., Sica V., Williams-Ignarro S., Zhang H., Slutsky A.S., Ignarro L.J., Napoli C. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 40 (3): 398–406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.054>. PMID: 16443154
5. Михальчик Е.В., Будкевич Л.И., Питерская Ю.А., Пенков Л.Ю., Астамирова Т.С., Смолина Н.В., Вахрушева Т.В., Панасенко О.М. Роль миелопероксидазы нейтрофилов в развитии воспаления при термических ожогах кожи. *Биомед. химия*. 2016; 62 (5): 584–587. <http://dx.doi.org/10.18097/PBMC20166205584>. PMID: 27797335
6. Bernal M.E., Varon J., Acosta P., Montagnier L. Oxidative stress in critical care medicine. *Int. J. Clin. Pract.* 2010; 64 (11): 1480–1488.

The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (Project No. 14-15-00375).

Acknowledgments

The authors would like to express their sincere gratitude to the staff of the Department of Acute Thermal Lesions and the staff of the Laboratory of Clinical Immunology, N.V. Sklifosovsky Research Institute, as well as to employees of the Burn Center of A.V. Vishnevsky Institute of Surgery for their support with the study and for their involvement in the discussion of the work.

Таким образом, можно утверждать, что предлагаемая методика перспективна как лабораторный метод оценки функциональной активности нейтрофилов и может дать ценную информацию в плане прогноза развития и тяжести гнойно-септических осложнений у пациента, а также может использоваться для получения опережающих индикаторов эффективности применяемого лечения. В перспективе представляется целесообразным увеличить численность обследуемых, а также апробировать методику на пациентах с сепсисом различной этиологии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00375).

Благодарности

Авторы выражают искреннюю признательность коллективу отделения острых термических поражений и коллективу лаборатории клинической иммунологии НИИ СП им. Н. В. Склифосовского, также сотрудникам ожогового центра института хирургии им. А. В. Вишневского за поддержку в организации и проведении исследования и участие в обсуждении работы.

References

1. Alekseyev A.A., Krutikov M.G., Yakovlev V.P. Burn infection: etiology, pathogenesis, diagnosis, prevention and treatment. Moscow: Vuzovskaya Kniga; 2010: 416. [In Russ.]
2. Ronat J.B., Kakol J., Khoury M.N., Berthelot M., Yun O., Brown V., Murphy R.A. Highly drug-resistant pathogens implicated in burn-associated bacteremia in an iraqi burn care unit. *PLoS One*. 2014; 9 (8): e101017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101017>. PMID: 25111170
3. Calum H., Moser C., Jensen P.Ø., Christophersen L., Maling D.S., van Gennip M., Bjarnsholt T., Hougen H.P., Givskov M., Jacobsen G.K., Hoiby N. Thermal injury induces impaired function in polymorphonuclear neutrophil granulocytes and reduced control of burn wound infection. *Clin. Exp. Immunol.* 2009; 156 (1): 102–110. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03861.x>. PMID: 19210518
4. Crimi E., Sica V., Williams-Ignarro S., Zhang H., Slutsky A.S., Ignarro L.J., Napoli C. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 40 (3): 398–406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.054>. PMID: 16443154
5. Mikhalchik E.V., Budkevich L.I., Piteriskaya Y.A., Penkov L.Y., Astamirova T.S., Smolina N.V., Vakhruшева T.V., Panasenکو O.M. The role of neutrophil myeloperoxidase in the development of inflammation after thermal skin burns. *Biomed. Khim.* 2016; 62 (5): 584–587. <http://dx.doi.org/10.18097/PBMC20166205584>. PMID: 27797335. [In Russ.]
6. Bernal M.E., Varon J., Acosta P., Montagnier L. Oxidative stress in critical care medicine. *Int. J. Clin. Pract.* 2010; 64 (11): 1480–1488.

- <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-1241.2010.02506.x> PMID: 20846195
7. Weiss J., Kirsner R.S. JID VisualDx Quiz: March 2014. Thermal burn. Burn wounds induce elevated catecholamines. Prolonged neutrophil lifespan delays healing. *J. Invest. Dermatol.* 2014; 134 (3): e14. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.546>. PMID: 24518115
 8. Parment K., Zetterberg A., Ernerudh J., Bakteman K., Steinwall I., Sjöberg F. Long-term immunosuppression in burned patients assessed by *in vitro* neutrophil oxidative burst (Phagoburst). *Burns.* 2007; 33 (7): 865–871. <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2006.11.011>. PMID: 17537580
 9. Сахаров С.П., Козлов Л.Б. Особенности развития инфекционного процесса, вызванного культивируемыми и некультивируемыми бактериями на фоне ожоговой травмы в эксперименте. *Общая реаниматология.* 2015; 11 (5): 15–24. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-5-15-24>
 10. Карпов О.Э., Гусаров В.Г., Лашенкова Н.Н., Петрова Н.В., Демениенко М.В., Шилкин Д.Н., Нестерова Е.Е., Замятин М.Н. Регистр микроорганизмов как инструмент автоматизированного планирования потребления антибиотиков и контроля антибиотикорезистентности в отделениях реаниматологии и профильных отделениях. *Общая реаниматология.* 2016; 12 (6): 39–48. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2016-6-39-48>
 11. Кулабухов В.В., Рябов Г.А. Современные методы оценки кислородного статуса организма и возможности метаболического мониторинга критических состояний. *Кремлевская медицина. Клинический вестник.* 1996; 2: 43–45.
 12. Cassatella M.A. Hey, brother neutrophil, what are you up to? *Semin. Immunol.* 28 2016; 28 (2): 81–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2016.05.002>. PMID: 27179686
 13. Dahlgren C., Karlsson A., Bylund J. Measurement of respiratory burst products generated by professional phagocytes. In: Quinn M.T., DeLeo F.R., Bokoch G.M. (eds.). *Neutrophil methods and protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 2007: 349–363.
 14. Владимиров Ю.А., Прокурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биол. химии.* 2009; 49: 341–388.
 15. Образцов И.В., Гудков М.А. Хемилюминесцентный анализ клеток крови в медицине: история, теория, практика. *Молекулярная медицина.* 2013; 4: 3–9.
 16. Образцов И.В., Гудков М.А., Полимова А.М., Демин Е.М., Прокурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Оценка функциональной активности нейтрофилов цельной крови методом двухстадийной стимуляции: новый подход к хемилюминесцентному анализу. *Рос. иммунологический журнал.* 2015; 9 (4): 418–425.
 17. Torabi M., Moeinaddini S., Mirafzal A., Rastegari A., Sadeghkhani N. Shock index, modified shock index, and age shock index for prediction of mortality in Emergency Severity Index level 3. *Am. J. Emerg. Med.* 2016; 34 (11): 2079–2083. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajem.2016.07.017>. PMID: 27461887
 18. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M., Sibbald W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992; 101 (6): 1644–1655. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>. PMID: 1303622
 19. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Coopersmith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll T., Vincent J.L., Angus D.C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016; 315 (8): 801–810. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2016.0287>. PMID: 26903338
 20. Колкер И.И. Инфекция и иммунитет при термических поражениях. *Хирургия. Журн. им. Н.И.Пирогова.* 1980; 5: 17–21. PMID: 6772869
 21. Маянский А.Н. Патогенетические аспекты нейтрофилзависимых реакций. *Патол. физиол. и эксперим. терапия.* 1989; 6: 80–85.
- <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-1241.2010.02506.x> PMID: 20846195
7. Weiss J., Kirsner R.S. JID VisualDx Quiz: March 2014. Thermal burn. Burn wounds induce elevated catecholamines. Prolonged neutrophil lifespan delays healing. *J. Invest. Dermatol.* 2014; 134 (3): e14. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.546>. PMID: 24518115
 8. Parment K., Zetterberg A., Ernerudh J., Bakteman K., Steinwall I., Sjöberg F. Long-term immunosuppression in burned patients assessed by *in vitro* neutrophil oxidative burst (Phagoburst). *Burns.* 2007; 33 (7): 865–871. <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2006.11.011>. PMID: 17537580
 9. Sakharov S.P., Kozlov L.B. Specific features of development of the infectious process caused by cultivable and non cultivable bacteria in the presence of experimental burn injury. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology.* 2015; 11 (5): 15–24. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-5-15-24>. [In Russ., In Engl.]
 10. Karpov O.E., Gusarov V.G., Lashenkova N.N., Petrova N.V., Dementienko M.V., Shilkin D.N., Nesterova E.E., Zamyatin M.N. Register of microorganisms as a tool for automated antibiotics consumption planning and monitoring of antibiotic resistance in intensive care units and specialized hospital departments. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology.* 2016; 12 (6): 39–48. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2016-6-39-48>. [In Russ., In Engl.]
 11. Kulabukhov V.V., Ryabov G.A. Current methods of the oxidative status evaluation and the capabilities of metabolic monitoring in critical conditions. *Kremlevskaya Meditsina. Klinichesky Vestnik.* 1996; 2: 43–45. [In Russ.]
 12. Cassatella M.A. Hey, brother neutrophil, what are you up to? *Semin. Immunol.* 28 2016; 28 (2): 81–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2016.05.002>. PMID: 27179686
 13. Dahlgren C., Karlsson A., Bylund J. Measurement of respiratory burst products generated by professional phagocytes. In: Quinn M.T., DeLeo F.R., Bokoch G.M. (eds.). *Neutrophil methods and protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 2007: 349–363.
 14. Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V. Free radicals and cellular chemiluminescence. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii.* 2009; 49: 341–388. [In Russ.]
 15. Obratsov I.V., Godkov M.A. Chemiluminescent analysis of the blood cells in medicine: history, theory, practice. *Molekulyarnaya Meditsina.* 2013; 4: 3–9. [In Russ.]
 16. Obratsov I.V., Godkov M.A., Polimova A.M., Demin E.M., Proskurnina E.V., Vladimirov Yu.A. Evaluation of the functional activity of whole blood neutrophils by a two-stage stimulation: a new approach to the chemiluminescent analysis. *Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal.* 2015; 9 (4): 418–425. [In Russ.]
 17. Torabi M., Moeinaddini S., Mirafzal A., Rastegari A., Sadeghkhani N. Shock index, modified shock index, and age shock index for prediction of mortality in Emergency Severity Index level 3. *Am. J. Emerg. Med.* 2016; 34 (11): 2079–2083. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajem.2016.07.017>. PMID: 27461887
 18. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M., Sibbald W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992; 101 (6): 1644–1655. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>. PMID: 1303622
 19. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Coopersmith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll T., Vincent J.L., Angus D.C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016; 315 (8): 801–810. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2016.0287>. PMID: 26903338
 20. Kolker I.I. Infection and immunity in burns. *Khirurgiya. Zhurnal Imeni N.I.Pirogova.* 1980; 5: 17–21. PMID: 6772869. [In Russ.]
 21. Mayansky A.N. Pathogenetic aspects of neutrophil-dependant reactions. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya Terapiya.* 1989; 6: 80–85. [In Russ.]

Поступила 05.06.16

Received 05.06.16