

# СОСТОЯНИЕ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

С.А. Кантюков, Л.В. Кривохижина, Р.Р. Фархутдинов\*

Челябинская государственная медицинская академия, г. Челябинск;

\*Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

В настоящем исследовании определена интенсивность свободно-радикального окисления при экспериментальной ожоговой травме средней и тяжелой степени тяжести. Свободно-радикальное окисление в крови исследовали методом железа индуцированной хемилюминесценции. Показано, что термическая травма независимо от степени тяжести сопровождается активацией свободно-радикального окисления. Интенсивность свободно-радикального окисления зависит от тяжести ожоговой травмы. Для стадии ожоговой токсемии при ожогах 3–4 степени тяжести характерно снижение в крови гидроперекисей липидов и интенсивности окисления липидов.

*Ключевые слова:* термическая травма, свободно-радикальное окисление, хемилюминесценция.

При термических травмах возникают благоприятные патофизиологические и биохимические условия для ускорения процессов свободно-радикального окисления. К ним относятся – гипоксия, активация клеток воспаления и гемостаза, возрастание функции органов детоксикации, усиление липолиза и повышение содержания в крови жирных кислот, истощение систем антиоксидантной защиты [2, 4, 8, 11, 13, 14].

В то же время в ряде публикаций указывается на снижение интенсивности данного процесса из-за повышенного расхода жирных кислот, в первую очередь полиненасыщенных, понижения «окисляемости» липидов, угнетающего влияния ряда биохимических компонентов ожоговой токсемии, таких как фракции средних молекул (молекулярной массой от 1000 до 5000 дальтон), холестерина, мочевины, билирубина и других [1, 12, 15, 16].

Изменения характера и интенсивности свободно-радикального окисления могут зависеть от стадии и тяжести ожоговой болезни.

Целью исследования было определение интенсивности свободно-радикального окисления при термической травме (стадии ожогового шока и ожоговой токсемии) разной степени тяжести.

## Методы исследования

Термическую травму вызывали под эфирным наркозом у взрослых белых крыс массой 150–200 г погружением эпилированной спинки на 1–3 секунды в кипящую воду. Животные были разделены на 3 группы: первая – контрольная и две – опытные. Вторая группа – площадь ожога до 20 % от поверхности тела, 1–2 степень; третья группа – до 40 %, 3–4 степень тяжести. Сроки наблюдения: 1-е сутки – стадия ожогового шока, 3-и, 5-е сутки – стадия ожоговой токсемии.

Интенсивность свободно-радикального окисления в крови исследовали методом железа индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) плазмы на приборе ХЛ-003. Проверку стабильности работы прибора проводили по излучению эталона СФХМ-1 (ГОСТ 9411–81). Интенсивность свечения эталона составляла  $5,1 \cdot 10^5$  квантов в секунду. Данная величина была принята за одну условную единицу. Плазму крови готовили, используя в качестве антикоагулянта цитрат натрия. Перед измерением свечения 0,5 мл плазмы разводили в 18,5 мл солевого раствора следующего содержания: 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 105 мМ  $\text{KCl}$ , величину рН которого доводили до 7,45 ед. Свечение индуцировали добавлением 1 мл  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , оптимальная концентрация которого составила 2,5 мМ в среде инкубации. Метод железа индуцированной ХЛ позволяет оценить интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ). Учитывали следующие показатели ХЛ: спонтанное свечение плазмы (СП), амплитуду быстрой вспышки (А), светосумму свечения (S).

Диеновые конъюгаты (ДК) определяли экстракцией в среде хлороформ-метанол [20]. ТБК-активные продукты определяли по образованию окрашенного продукта в реакции с тиобарбитуровой кислотой [21].

Концентрацию фракции с молекулярной массой от 500 до 5000 дальтон определяли измерением оптической плотности плазмы крови при длине волны 254 нм [18]. Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ «Statistica v. 6.0 for Windows» [10, 17]. Для описания результатов использовали М-среднее значение признака, стандартную ошибку среднего, s-среднее квадратичное отклонение, характеристику выборки пред-

ставляли в формате  $M + m$ . Для анализа нормальности распределения данных применяли критерий Шапиро–Уилка. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием параметрических (Стьюдента) и непараметрических (Манна–Уитни) критериев. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты исследования

Исследование природы ХЛ плазмы и сывотки крови, развивающейся при добавлении солей двухвалентного железа, показало, что при наличии гидроперекисей липидов ионы железа реагируют с ними с образованием перекисных радикалов. Доказательством связи железо индуцированной ХЛ со свободно-радикальным окислением липидов служит параллелизм между интенсивностью свечения, потреблением кислорода и накоплением продуктов перекисного окисления липидов, в частности, малонового диальдегида и диеновых конъюгатов [3, 7, 14]. Переход свечения из одной фазы в другую зависит от стадий окисления. Амплитуда быстрой вспышки определяется содержанием в крови гидроперекисей липидов и скоростью окисления ионов двухвалентного железа. Начало медленной вспышки вызвано свободно-радикальным окислением липидов, главным образом, суммарной фракции липопротеинов низкой и очень низкой плотности [5, 6, 22]. Их увеличение в крови или структурные изменения молекул ведут к возрастанию свечения [9]. Выравнивание скорости образования и распада гидроперекисей становится причиной перехода медленной вспышки в стационарное свечение.

Таким образом, спонтанное свечение (СП)

плазмы крови характеризует интенсивность перекисного окисления без вмешательства извне; амплитуда быстрой вспышки (А) – наличие в крови гидроперекисей липидов; светосумма свечения (S) – количество и способность липидов крови подвергаться окислению.

Запись стандартной хемиллюминограммы представлена на рис. 1.

При анализе ХЛ плазмы крови учитывали следующие показатели – спонтанное свечение (СП), амплитуду быстрой вспышки (А) и светосумму свечения медленной вспышки (S).

Показатели ХЛ плазмы и содержание в крови продуктов перекисного окисления липидов при термической травме представлены в таблице.

Независимо от тяжести ожоговой травмы регистрируется активация свободно-радикального окисления, что подтверждается достоверным возрастанием относительно контроля СП и ДК во все сроки исследования. Но СП на всех сроках исследования была достоверно ниже при ожогах 3–4 степени тяжести относительно ожогов 1–2 степени.

Количество ДК и ТБК-активных продуктов на 1-е и 5-е сутки ожоговой травмы выше при ожогах 3–4 степени тяжести относительно ожогов 1–2 степени. Более того, количество ТБК – активных продуктов при ожогах 1–2 степени на 1,5 сутки не отличается от контрольных значений, а при ожогах 3–4 степени тяжести превосходит контрольные величины в 2 раза.

Таким образом, интенсивность и скорость свободно-радикального окисления выше при ожогах 3–4 степени тяжести, что подтверждается более низкими показателями СП на всех сроках на-

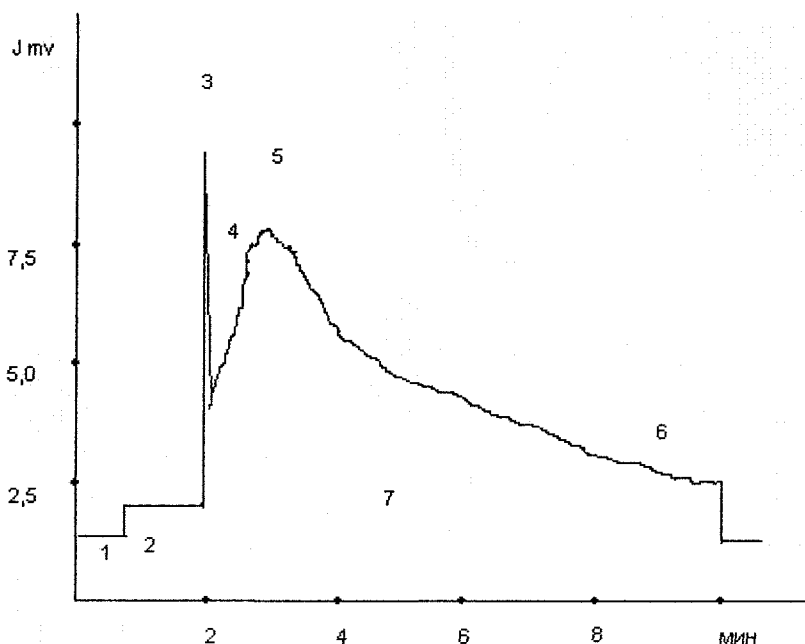


Рис. 1. Запись хемиллюминесценции плазмы крови здорового человека: 1 – темновой ток; 2 – спонтанное свечение; 3 – быстрая вспышка; 4 – латентный период; 5 – медленная вспышка; 6 – стационарное свечение; 7 – светосумма хемиллюминесценции

ХЛ плазмы и содержание в крови продуктов перекисного окисления липидов  
при термической травме (хемилюминесценция, усл. ед.)

Условия эксперимента	СП	A	S	ДК, ед.Е/мл	ТБК-АП, ед.Е/мл
Контроль 1 группа (n = 20)	3,13 ± 0,2	75,1 ± 2,5	21,4 ± 0,3	0,09 ± 0,007	0,04 ± 0,001
1 сутки 2 группа (n = 10)	6,4 ± 0,4 ***	74,9 ± 3,2	25,2 ± 0,5 ***	0,127 ± 0,005 ***	0,04 ± 0,004
3 сутки 2 группа (n = 10)	8,2 ± 0,4 ***	98,6 ± 3,3 ***	29,6 ± 0,9 ***	0,14 ± 0,007 ***	0,08 ± 0,005 ***
5 сутки 2 группа (n = 10)	5,6 ± 0,5 ***	84,31 ± 3,1 *	25,0 ± 0,4 ***	0,118 ± 0,005 ***	0,05 ± 0,004
1 сутки 3 группа (n = 10)	4,3 ± 0,2 *** ▼▼▼	71,9 ± 3,8	27,2 ± 0,6 ***	0,15 ± 0,005 *** ▼▼▼	0,066 ± 0,006 *** ▼▼▼
3 сутки 3 группа (n = 10)	4,4 ± 0,3 *** ▼▼▼	65,7 ± 2,1 *** ▼▼▼	17,1 ± 0,4 *** ▼▼▼	0,13 ± 0,004 ***	0,08 ± 0,003 ***
5 сутки 3 группа (n = 10)	3,8 ± 0,2 * ▼▼▼	55 ± 1,9 *** ▼▼▼	15,6 ± 0,4 *** ▼▼▼	0,14 ± 0,004 *** ▼▼▼	0,09 ± 0,005 *** ▼▼▼

Примечания: \* – достоверность относительно контроля, ▼ – достоверность между 2 и 3 группой; количество знаков обозначает – p < 0,05; < 0,01; < 0,001.

блюдения (рис. 2), но достоверно более высокими величинами ДК и ТБК-активных продуктов на 1-е и 5-е сутки после травмы (рис. 3, 4).

Более низкие показатели спонтанной (СП) хемилюминесценции при ожогах 3–4 степени могут быть обусловлены – повышением скорости окисления на фоне истощения антиоксидантной защиты и (или) количественным снижением субстратов для окисления. В литературе указывается, что в период ожогового шока происходит активация процессов липолиза с увеличением количества

триацилглицеринов и их переносчиков – липопротеинов очень низкой плотности; отмечается резкое торможение липогенеза, что проявляется в снижении уровня холестерина, липопротеинов высокой плотности и липопротеинов низкой плотности; разобщение всех звеньев липидного обмена – синтеза, транспорта, снижение периода полужизни липидов [1].

При ожогах 3–4 степени тяжести содержание в крови гидроперекисей липидов было ниже, чем в группе контроля и ожогах 1–2 степени. Доказа-

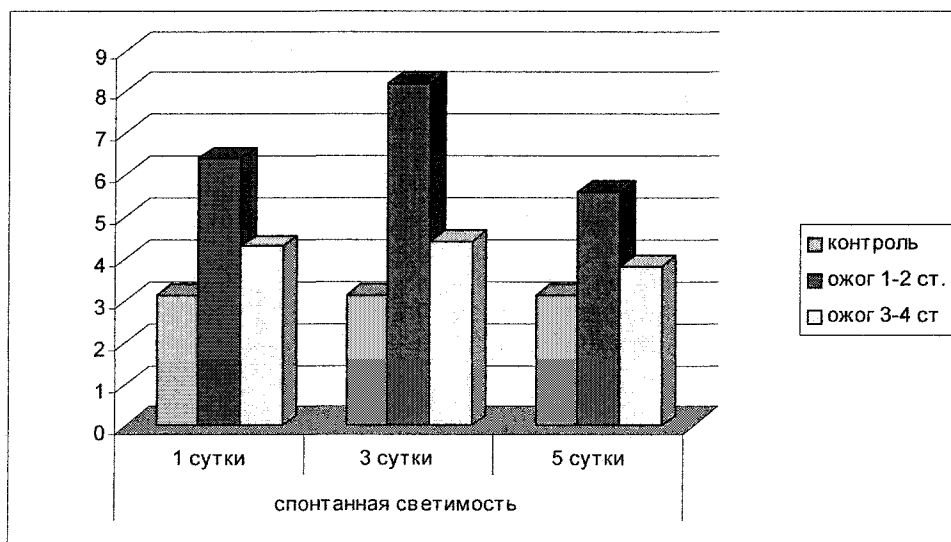


Рис. 2. Показатели спонтанной хемилюминесценции после термической травмы на 1–5-е сутки эксперимента. По оси Y – интенсивность свечения, усл. ед.; по оси X – время, сут

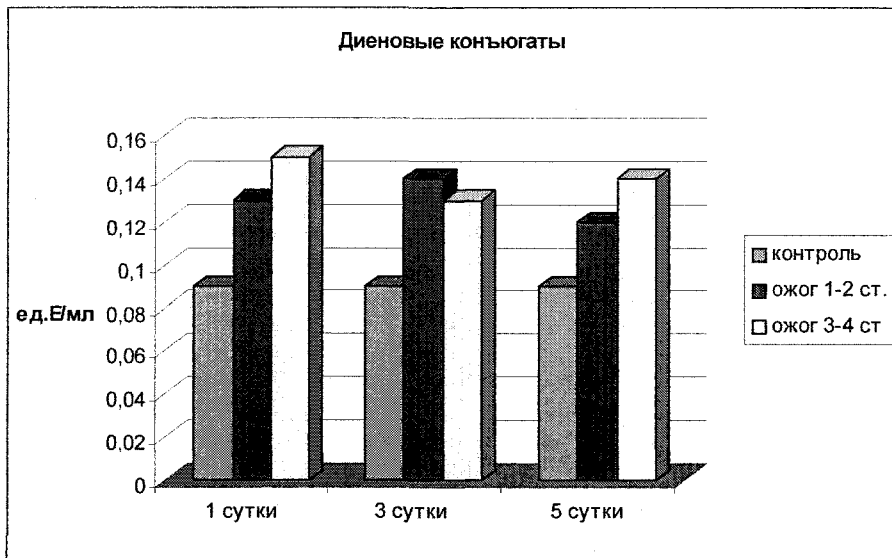


Рис. 3. Содержание диеновых конъюгатов после термической травмы на 1–5-е сутки эксперимента

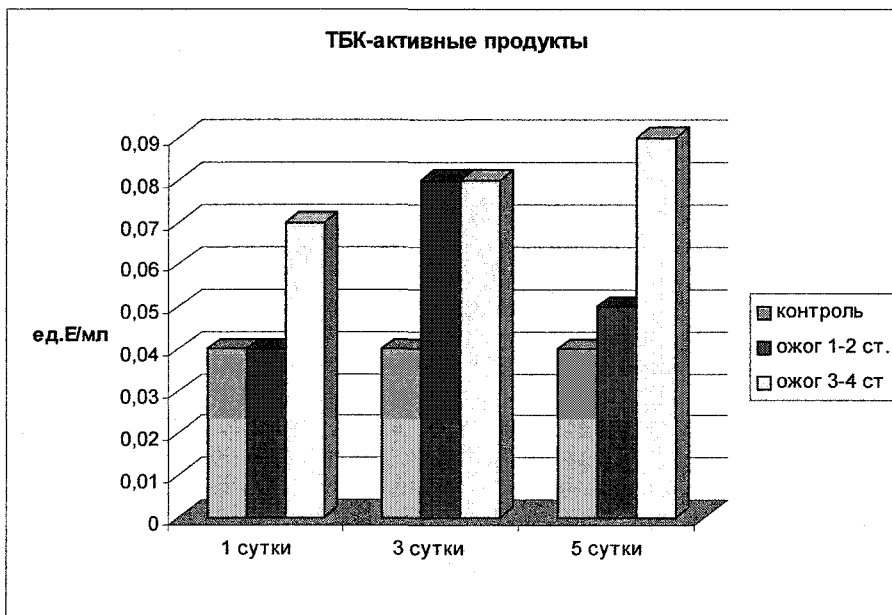


Рис. 4. Содержание ТБК-активных продуктов после термической травмы на 1–5-е сутки эксперимента

тельством являются различия по показателям амплитуды быстрой вспышки. Амплитуда быстрой вспышки (A) при ожогах 1–2 степени тяжести была выше контрольных значений на 3–и–5-е сутки, при тяжелых ожогах амплитуда быстрой вспышки в эти же сроки снижалась относительно контроля и ожога 1–2 степени (рис. 5).

Светосумма свечения (S) возрастала на 1 сутки после ожоговой травмы независимо от степени поражения и оставалась выше контрольных значений при ожогах 1–2 степени на 3–и–5-е сутки. При ожогах 3–4 степени тяжести светосумма свечения на 3–и, 5-е сутки была снижена не только относительно контроля, но и относительно ожогов 1–2 степени (рис. 6).

Тяжесть ожоговой травмы определяет динамику изменений показателей A и S. Амплитуда быстрой вспышки (A) и светосумма (S) свечения при ожогах 3–4 степени тяжести постепенно снижались и на 5-е сутки были ниже ( $p < 0,001$ ) относительно первых суток ожоговой травмы. Подобная закономерность отсутствует при ожогах 1–2 степени тяжести.

Более низкие значения амплитуды быстрой вспышки и светосуммы свечения могут быть связаны с уменьшением количества легко окисляемых полиненасыщенных жирных кислот и накоплением в крови веществ подавляющих окисление. Указывается, что в крови пациентов при ожогах пре-

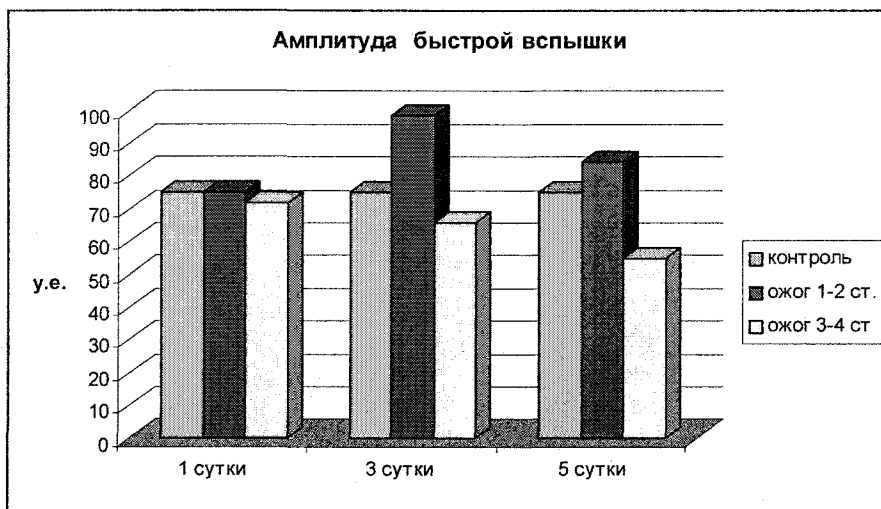


Рис. 5. Показатели амплитуды быстрой вспышки после термической травмы на 1–5-е сутки эксперимента

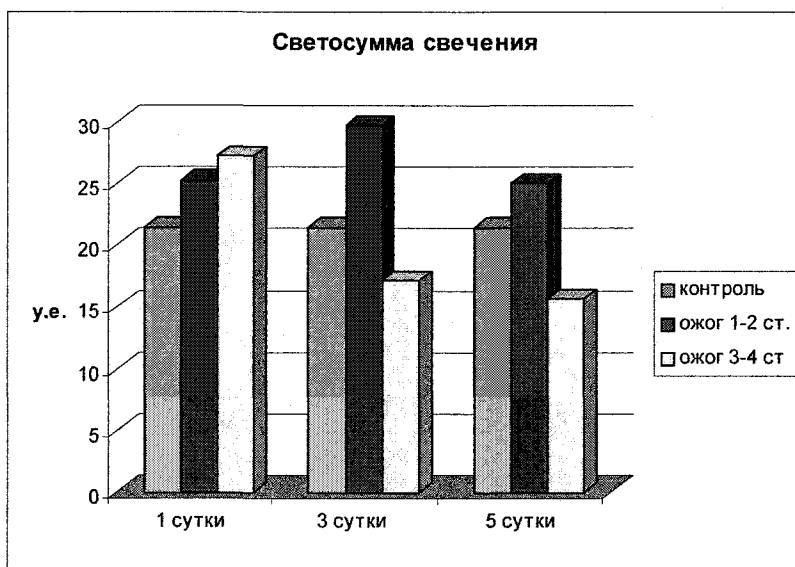


Рис. 6. Показатели светосуммы хемилюминесценции после термической травмы на 1–5-е сутки эксперимента

D254

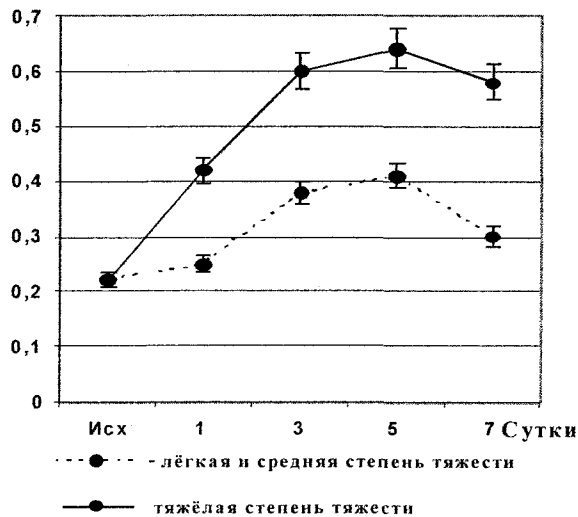


Рис. 7. Изменение содержания молекул средней молекулярной массы при термической травме разной степени тяжести. По оси Y – содержание MCM в плазме крови, ед. оптической плотности; по оси X – время, прошедшее после нанесения термической травмы, сут

обладают насыщенными или моноеновыми жирными кислотами, необходимые для устранения дефицита энергии, а полиеновые жирные кислоты используются в качестве пластического материала для синтеза гормонов [12]. При выраженной токсемии отмечается увеличение молекул средней молекулярной массы от 500 до 5000 тысяч дальтон – (МСММ), которые способны подавлять перекисное окисление липидов [19].

Установлены различия в динамике и количественном представительстве средних молекул при ожоговой травме различной степени тяжести (рис. 7).

При 1–2 степени термической травмы количество средних молекул возрастало не более чем в 1,5 раза к 3–5-м суткам. В случаях 3–4 степени происходило более быстрое (на 2-е–3-и сутки) и более интенсивное (в 3–4) раза нарастание средних молекул.

При ожогах 1–2 степени тяжести нет соответствия динамики изменения светосуммы и МСММ (рис. 8) и отсутствует корреляция между этими показателями.

При термической травме 3–4 степени тяжести изменения этих показателей противоположны (рис. 9) и существует достоверная отрицательная связь ( $r = -0,78$ ).

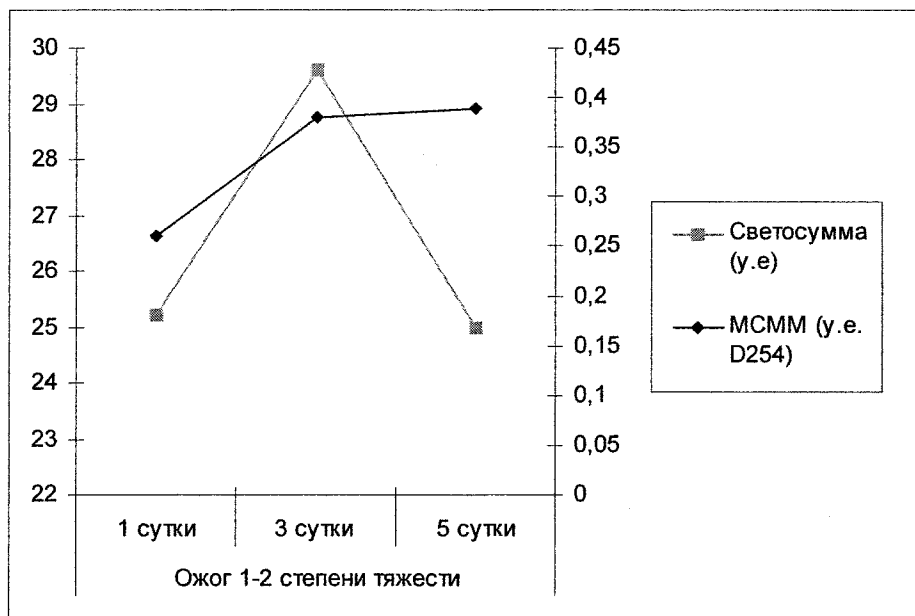


Рис. 8. Динамика изменений светосуммы свечения и молекул средней молекулярной массы при термической травме 1–2 степени тяжести

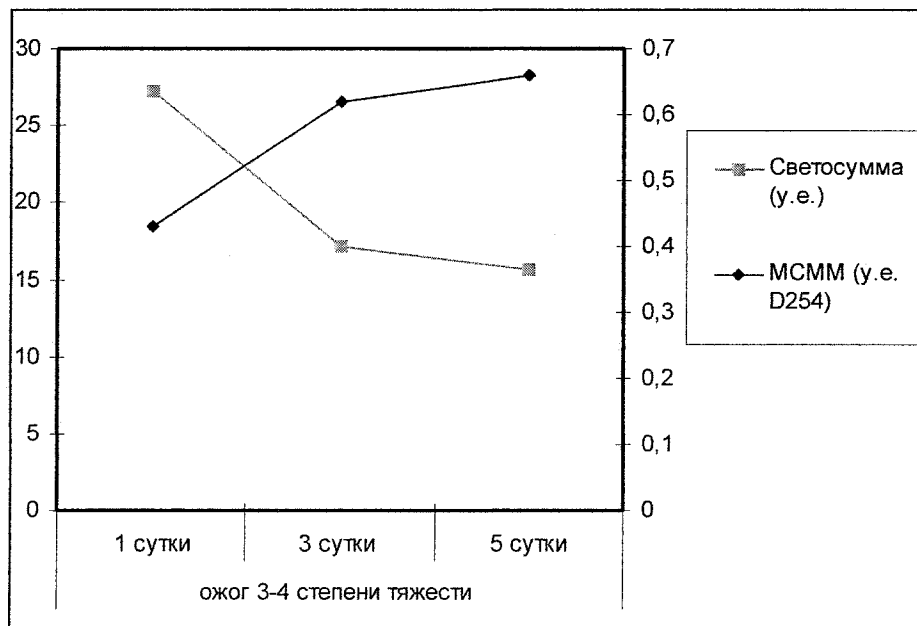


Рис. 9. Динамика изменений светосуммы свечения и молекул средней молекулярной массы при термической травме 3–4 степени тяжести

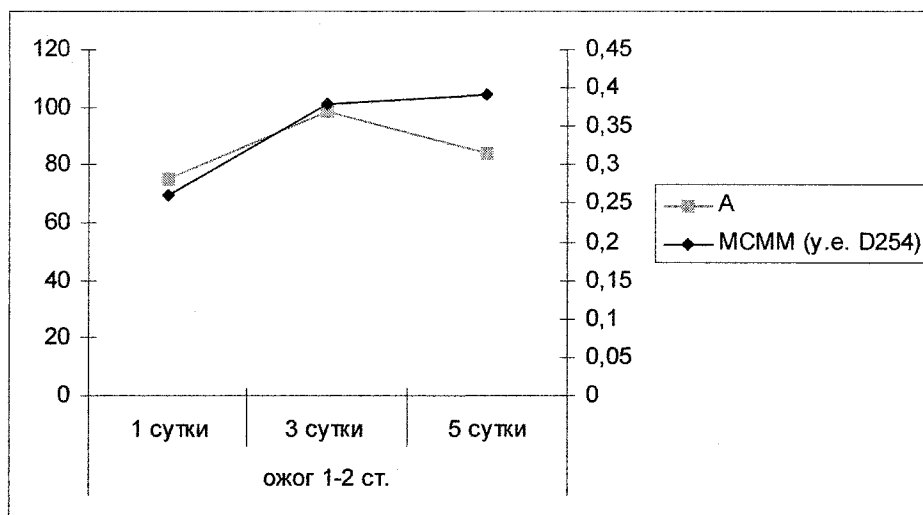


Рис. 10. Динамика изменений амплитуды быстрой вспышки (А) и молекул средней молекулярной массы при термической травме 1–2 степени тяжести

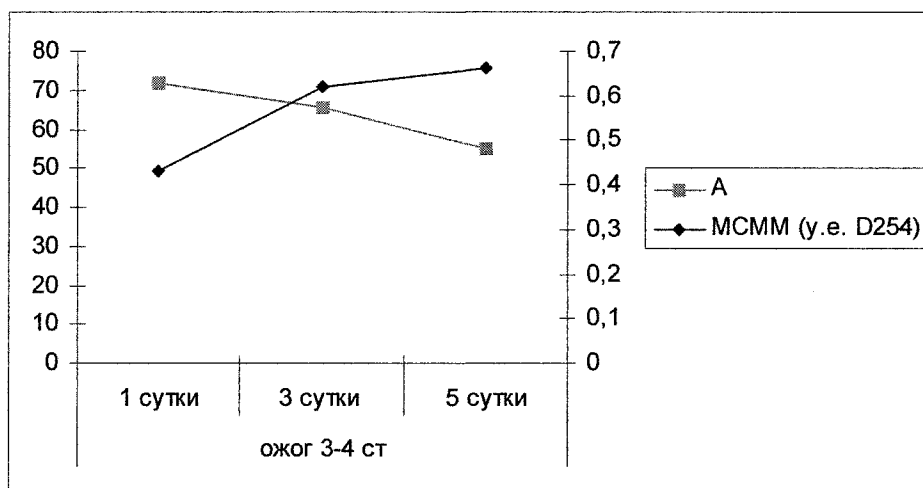


Рис. 11. Динамика изменений амплитуды быстрой вспышки (А) и молекул средней молекулярной массы при термической травме 3–4 степени тяжести

Точно такая же закономерность установлена и для амплитуды быстрой вспышки (рис. 10, 11).

Таким образом, при термической травме 3–4 степени снижение амплитуды быстрой вспышки и светосуммы свечения может быть связано с нарастанием в крови молекул средней молекулярной массы.

#### Выводы

1. Установлено, что в крови при термической травме активируется свободно-радикальное окисление.

2. Интенсивность свободно-радикального окисления зависит от тяжести термической травмы.

3. Для стадии ожоговой токсемии при термической травме 3–4 степени тяжести характерно снижение в крови гидроперекисей липидов и интенсивности окисления липидов.

#### Литература

1. Артемьев, С.А. Содержание липидов сыворотки крови при обширных ожогах у детей разно-

го возраста / С.А. Артемьев, Н.И. Камзалакова, Г.В. Булыгин // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – № 4. – С. 93–99.

2. Биленко, М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения) / М.В. Биленко. – М.: Медицина, 1989. – 368 с.

3. Владимиров, Ю.А. Информация анализа кривых хемилюминесценции при перекисном окислении липидов / Ю.А. Владимиров, В.И. Оленев, Т.Б. Сулова // Труды 2-го МОЛГМИ – М., 1974. – Т. 9, № 8. – С. 6–34.

4. Владимиров, Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 252 с.

5. Владимиров, Ю.А. Свечение, сопровождающее биохимические реакции / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 6. – С. 25–32.

6. Владимиров, Ю.А. Физико-химические ос-

новы фото-биологических процессов / Ю.А. Владимиров, А.Я. Потапенко. – М.: Высш. шк., 1989. – 199 с.

7. Владимиров, Ю.А. Хемилюминесценция плазмы крови в присутствии ионов двухвалентного железа / Ю.А. Владимиров, А.П. Шаров, Э.Ф. Милютин // *Биофизика*. – 1973. – Т. 18, №1. – С. 148–152.

8. Влияние антиоксидантов на изменение состава липидов лизосом печени крыс после термического ожога / Е.Б. Бурлакова, Т.Л. Заец, Н.И. Дубинская и др. // *Патол. физиол. и эксперим. терапия*. – 1984. – № 5. – С. 13–17.

9. Воскресенский, О.Н. Свободно-радикальное окисление бета-липопротеинов плазмы крови и его роль в атерогенезе / О.Н. Воскресенский, Т.И. Устьянская // *Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животных и человека*. – Л., 1978. – С. 105–106.

10. Глац, С. Медико-биологическая статистика / С. Глац. – М.: Практика, 1999. – 438 с.

11. Зенков, Н.К. Окислительный стресс. Диагностика, терапия, профилактика / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньшикова, С.М. Шергин. – Новосибирск, 1993. – 181 с.

12. Курашвили, Л.В. Липидный обмен при неотложных состояниях / Л.В. Курашвили, В.Г. Васильков. – Пенза, 2003. – 202 с.

13. Медведев, Ю.В. Гипоксия и свободные радикалы в развитии патологических состояний организма / Ю.В. Медведев, А.Д. Толстой. – Москва, 2000. – 227 с.

14. Меньшикова, Е.Б. Биохимия окислительного стресса. Оксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньшикова, Н.К. Зенков, С.М. Шергин. – Новосибирск, 1994. – 203 с.

15. Мхитарян, В.Г. Влияние  $\alpha$ -токоферола на активность некоторых ферментов биосинтеза

и распада фосфолипидов при ожоговой травме / В.Г. Мхитарян, М.И. Агаджанов, П.А. Казарян // *Вопросы мед. химии*. – 1979. – № 6. – С. 698–704.

16. Особенности метаболизма токсемического периода ожоговой болезни / Ф.Х. Камилов, Г.П. Ефименко, В.С. Якушев и др. // *Метаболические основы острой ожоговой токсемии: сб. науч. работ*. – Омск, 1977. – № 129. – С. 25–123.

17. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера, 2006. – 312 с.

18. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях (методические рекомендации) / Н.И. Габриэлян, Э.Р. Левицкий, А.А. Дмитриев и др. – М., 1985 – 32 с.

19. «Средние молекулы» и продукты перекисного окисления липидов как система неспецифических регуляторов гемодинамики у спортсменов-лыжников / И.А. Волчегорский, Д.А. Дятлов, Л.М. Куликов и др. // *Физиология человека*. – 1996. – Т. 22, № 6. – С. 106–110.

20. Стальная, И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // *Современные методы в биохимии*. – М., 1977. – С. 63–64.

21. Стальная, И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаршвили // *Современные методы в биохимии*. – М., 1977. – С. 66–68.

22. Фархутдинов Р.Р. Хемилюминесценция плазмы крови и её фракций, индуцированная ионами двухвалентного железа / Р.Р. Фархутдинов, Ю.А. Владимиров // *Сверхслабое свечение плазмы крови в клинической диагностике: тр. 2-го МОЛГМИ*. – М., 1974. – Т. 9. – Вып. 8. – С. 34–38.

*Поступила в редакцию 25 мая 2010 г.*