

***Перекисное окисление липидов при лечении
закрытых диафизарных переломов
с использованием гипербарической оксигенации***

С.Н. Лунева, Т.Н. Ерофеева, М.В. Стогов, С.А. Романенко, Е.В. Николайчук

***Lipid peroxidation in treatment of closed shaft fractures using
hyperbaric oxygenation***

S.N. Luniova, T.N. Yerofeyeva, M.V. Stogov, S.A. Romanenko, E.V. Nikolaichouck

Государственное учреждение

Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова, г. Курган
(генеральный директор — заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор В.И. Шевцов)

В работе представлен сравнительный анализ биохимических исследований плазмы крови пациентов с закрытыми диафизарными переломами костей голени при лечении методом чрескостного остеосинтеза по Илизарову, пролеченных с использованием гипербарической оксигенации (ГБО), и пациентов, проходивших курс лечения без ГБО-терапии. В плазме крови 33 пациентов определяли концентрацию продуктов перекисного окисления, в эритроцитах — ферментативную активность супероксиддисмутазы (СОД). Результаты исследования показали активацию реакций перекисного окисления, сопровождаемую ингибированием СОД в группах больных с применением ГБО, в отличие от группы пациентов, где сеансы ГБО-терапии не применялись. На основании проведенных исследований авторы делают вывод о необходимости ограничения продолжительности курса ГБО и возможности коррекции процесса липидной перекисной окисления антиоксидантными препаратами.

Ключевые слова: травма, гипербарическая оксигенация, перекисное окисление, антиоксиданты, остеосинтез по Илизарову.

The comparative analysis of biochemical studying blood plasma of patients with closed shaft fractures of leg bones is given during treatment by the transosseous osteosynthesis technique according to Ilizarov using hyperbaric oxygenation and patients treated without HBO-therapy. The concentration of peroxidation products was determined in blood plasma of 33 patients and enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) was determined in erythrocytes. The results of the study demonstrated activation of peroxidation reactions, accompanied by SOD inhibition in the groups of patients with HBO use unlike the group of patients without HBO use. On the basis of the study made the authors came to the conclusion about the necessity of limitation of HBO course duration and the possibility of correction of lipid peroxidation with the help of antioxidant preparations.

Keywords: trauma, hyperbaric oxygenation, peroxidation, antioxidants, osteosynthesis according to Ilizarov.

Известно, что важнейшим аспектом воздействия гипербарического кислорода на организм является его влияние на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и на антиоксидантную систему (АОС) организма [4]. ПОЛ представляет собой цепной свободнорадикальный процесс, постоянно протекающий во всех биологических системах. По механизму перекисного окисления осуществляются в организме многие ферментативные реакции моно- и диоксигеназного окисления: синтез простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов [6]. Благоприятное влияние процессов ПОЛ на организм человека проявляется в обновлении состава и поддержании свойств мембран, участии в энергетических процессах, клеточном делении, синтезе биологически активного вещества (БАВ) [3, 8, 10, 11-14]. На основе литературных данных можно сделать вывод, что перекисное окисление в определенной степени

происходит в норме, выполняя следующие функции: 1) деструкция чужеродного материала в фаголизосомах; 2) инактивация ксенобиотиков; 3) разборка мембранных структур в процессе регенерации; 4) регуляция вязкости мембраны; 5) участие в онтогенезе и клеточной пролиферации; 6) регуляция тонуса сосудов. Это дает возможность предположить, что в основе стимулирующего влияния гипербарического кислорода (ГБК) может лежать опосредованная активация через ПОЛ выше указанных процессов. Однако положительное влияние перекисного окисления сохраняется до тех пор, пока оно уравновешивается антиоксидантными (АО) механизмами организма.

В нормально функционирующих клетках содержание продуктов свободнорадикального окисления находится на крайне низком уровне, несмотря на обилие субстратов ПОЛ [1, 2]. Это

свидетельствует о достаточно мощной антиоксидантной защитной системе. Среди антиоксидантов выделяют специализированные ферментные и неферментные антиоксиданты (АО). К ферментам, оказывающим антиоксидантное действие, относятся супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, церулоплазмин, пероксидаза, цитохромоксидаза, некоторые медьсодержащие оксидазы, протеолитические ферменты клетки [5, 9]. Антиоксиданты неферментного действия представлены жирорастворимыми (токоферол, тканевые липиды, витамины К и А) и водорастворимыми (витамины С и Р, глутатион, стероидные гормоны, альбумин и др.) соединениями [5]. Постоянное образование прооксидантов в живых организмах уравновешено их дезактивацией АО, поэтому для поддержания гомеостаза необходима непрерывная регенерация антиоксидантной способности. Однако в условиях

внешнего воздействия, коим является и гипероксия, по мере истощения АО-резервов возрастает опасность неконтролируемого усиления реакций ПОЛ, окислительной деструкции и даже гибели клетки [1]. Поэтому возникает необходимость в контроле за состоянием АОС.

Таким образом, для оценки биохимических изменений, происходящих в организме человека в ответ на действие гипербарического кислорода при ГБО-терапии, на первый план выходит изучение состояния ПОЛ и АОС. В связи с тем, что литературные данные по изменению показателей ПО и активности АО ферментов в плазме крови после ГБО-терапии противоречивы, целью настоящего исследования явилось изучение процессов перекисного окисления во время лечения больных с закрытыми переломами костей голени с использованием гипербарической оксигенации в зависимости от сроков начала проведения сеансов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биохимические исследования проведены у 33 пациентов обоего пола с закрытыми диафизарными переломами костей голени в возрасте 17-50 лет (средний возраст 38 лет). Пациенты, проходившие курс лечения методом гипербарической оксигенации, были разделены на две группы: первую составили больные, которым назначали сеансы ГБО на второй неделе после операции (n=9), вторую группу составили больные, которым назначали ГБО на третьей неделе после операции (n=11). Пациенты обеих групп получили от 8 до 10 сеансов ГБО. Сеансы гипербарической оксигенации проводили в одноместной лечебной барокамере БЛКС 303 МК в режиме 1,4-1,6 АТА. В контрольную группу вошли пациенты (n=13) с закрытой травмой костей голени, которые проходили курс лечения методом чрескостного остеосинтеза без применения ГБО-терапии. За норму были приняты значения биохимических показателей 15 практически здоровых людей обоего пола этой же возрастной группы. Забор крови проводили до ГБО-терапии, после ГБО и перед снятием аппарата, у пациентов контрольной группы кровь брали в дни, которые соответствовали срокам «до ГБО» и «после ГБО».

Оценку процессов ПОЛ в условиях лечения травматологических больных методом ЧДО с применением ГБО осуществляли путем изме-

рения в плазме крови содержания первичных (диеновые конъюгаты - ДК) и вторичных (малоновый диальдегид - МДА) продуктов ПОЛ. Содержание ДК определяли спектрофотометрически по разности оптической плотности между опытной и контрольной пробамии при длине волны 232 нм [7]. Определение МДА проводили по реакции с тиобарбитуровой кислотой [7]. АОС оценивали, изучая активность фермента - супероксиддисмутаза модифицированным методом N. Nishikimi et al (1972). Концентрацию продуктов перекисного окисления рассчитывали на мг общих липидов плазмы крови, которые определяли с помощью наборов фирмы "La Chema" (Чехия).

В связи с тем, что исследуемые выборки из-за их малого объема не соответствовали нормальному распределению, математический анализ результатов проводили с использованием непараметрических критериев. Для описания результатов исследования рассчитывали медиану, 25-й и 75-й процентиля; оценку достоверности различия между исследуемыми группами проводили с помощью непараметрического W-критерия Вилкоксона (если выборка составляла 12 и больше значений) и критерия рандомизации (при выборке меньше 12).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика показателей ПОЛ и АОС в плазме крови в ходе лечения травматологических больных представлена в таблицах 1-3.

К началу сеансов ГБО происходило снижение концентрации малонового диальдегида в

плазме крови на 25,9 % ($p_w=0,04$), возрастала активность СОД на 83,3 % ($p_w=0,04$) (табл. 1). После прохождения курса ГБО-терапии у больных первой группы значимых изменений показателей перекисного окисления по сравнению с

соответствующими показателями контрольной группы не было. В обеих группах возрастала концентрация малонового диальдегида, а уровень диеновых конъюгатов не изменялся. Ферментативная активность супероксиддисмутазы после 10 сеансов гипербарической оксигенации значительно падала и составляла по медиане 9,06 мкМ НСТ $\times 10^9$ Эр/мин при норме 12,22 мкМ НСТ $\times 10^9$ Эр/мин, тогда как в контрольной группе она составляла 28,37 мкМ НСТ $\times 10^9$ Эр/мин.

На 24-е сутки после операции (табл. 2) в плазме крови у больных контрольной группы

концентрация продуктов перекисного окисления статистически значимо от нормы не отличалась, продолжала расти активность СОД в эритроцитах. После прохождения сеансов гипербарической оксигенации у пациентов второй группы снижалась ферментативная активность СОД в эритроцитах, приближаясь к норме. Наряду с этим возросла концентрация диеновых конъюгатов на 71,3 % по сравнению с уровнем ДК до начала ГБО ($p_R=0,03$).

Перед снятием аппарата (табл. 3) изучаемые показатели у больных контрольной и опытных групп достоверно от нормы не отличались.

Таблица 1

Концентрация продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови и ферментативная активность супероксиддисмутазы в эритроцитах пациентов первой и контрольной групп в ходе лечения переломов голени с применением ГБО

	Норма	12-е сутки после операции, до ГБО	24-е сутки после операции	
ДК, нмоль/мг липидов	2,57 (2,10÷3,00) n=15	2,68 (1,69÷3,22) n=12	После 10 сеансов ГБО (n=9)	2,94 (1,54÷5,24)
			Без ГБО (n=13)	2,51, (2,00÷3,70)
МДА, нмоль/мг липидов	1,16 (0,95÷1,39) n=12	0,86* (0,73÷1,01) n=11	После 10 сеансов ГБО (n=9)	1,11 [#] (0,60÷1,15)
			Без ГБО (n=14)	1,06 [#] (0,77÷1,44)
СОД, мкМ НСТ $\times 10^9$ Эр/мин	12,22 (11,33÷17,87) n=8	22,40* (17,38÷23,85) n=7	После 10 сеансов ГБО (n=7)	9,06* ^{###} (6,56÷12,37)
			Без ГБО (n=9)	28,37* [#] (22,37÷31,37)

* - достоверность различий с нормой при уровне значимости $p_W=0,04$; # - со сроком до ГБО # - $p_R=0,04$, ## - $p_R=0,002$.

Таблица 2

Концентрация продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови и ферментативная активность супероксиддисмутазы в эритроцитах пациентов второй и контрольной группы в ходе лечения переломов голени с применением ГБО

	Норма	24-е сутки после операции, до ГБО	32-е сутки после операции	
ДК, нмоль/мг липидов	2,57 (2,10÷3,00) n=15	2,51 (2,00÷3,70) n=13	После 8 сеансов ГБО (n=10)	4,30* ^{###} (3,57÷5,40)
			Без ГБО (n=7)	2,60 (2,45÷4,10)
МДА, нмоль/мг липидов	1,16 (0,95÷1,39) n=12	1,06 (0,77÷1,44) n=14	После 8 сеансов ГБО (n=9)	1,01 (0,81÷1,63)
			Без ГБО (n=7)	1,25 (1,05÷1,89)
СОД, мкМ НСТ $\times 10^9$ Эр/мин	12,22 (11,33÷17,87) n=8	28,37* (22,37÷31,37) n=9	После 8 сеансов ГБО (n=7)	13,82 [#] (10,93÷19,44)
			Без ГБО (n=6)	29,01** (26,07÷37,03)

* - достоверность различий с нормой при уровне значимости $p_W=0,02$, ** - $p_W=0,001$; # - со сроком до ГБО $p_R=0,03$.

Таблица 3

Концентрация продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови и ферментативная активность супероксиддисмутазы в эритроцитах пациентов всех группах перед снятием аппарата

	Норма	1 группа	2 группа	Без ГБО
ДК, нмоль/мг липидов	2,57 (2,10÷3,00) n=15	1,91 (1,90÷2,51) n=3	2,15 (1,98÷2,33) n=2	2,93 (1,60÷3,26) n=6
МДА, нмоль/мг липидов	1,16 (0,95÷1,39) n=12	0,62* (0,60÷0,63) n=2	1,00 (0,99÷1,02) n=2	0,76 (0,64÷1,12) n=6
СОД, мкМ НСТ $\times 10^9$ Эр/мин	12,22 (11,33÷17,87) n=8	15,15 (14,04÷16,27) n=2	13,60 (12,35÷14,84) n=2	18,63 (16,36÷20,82) n=3

* - достоверность различий с нормой $p_R=0,03$

ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставляя динамику изменения изученных показателей у группы пациентов, пролеченных без применения ГБО, и у двух групп больных, прошедших ГБО-терапию, можно сделать следующие выводы. В обеих опытных группах у пациентов гипербарическая оксигенация вызывала одинаковые изменения: рост суммарного содержания продуктов ПОЛ (рис. 1) и ингибирование активности СОД. При этом уровень диеновых конъюгат после сеансов ГБО-терапии возрастал более значительно, чем концентрация малонового диальдегида. Отмеченное преобладание первичных продуктов перекисного окисления – диеновых конъюгат после применения сеансов гипербарической оксигенации говорит о том, что процесс ПОЛ тормозился на первоначальных стадиях свободнорадикального окисления. Такая направленность реакций способствовала нормализации метаболических процессов, происходящих в организме, так как образование и накопление диеновых конъюгат облегчало самообновление мембранных структур и повышало проницаемость клеточных мембран, влияя на активность мембраносвязанных ферментов и ионный

транспорт. Выраженное снижение активности супероксиддисмутазы после ГБО, вероятно, обусловлено повышенным расходом фермента на нейтрализацию свободных радикалов. Кроме того, при активации процессов ПОЛ могло происходить и свободнорадикальное повреждение этого АО-фермента.

Таким образом, изменения системы ПОЛ-АОС после проведения ГБО-терапии при лечении больных с переломами костей голени методом чрескостного остеосинтеза связаны с активацией реакций ПОЛ, которые вызывали ингибирование АО – ферментов. Такие изменения лежат в основе эффекта воздействия гипербарического кислорода, которые, на наш взгляд, носят универсальный характер и мало зависят от времени назначения сеансов и типа скелетной травмы. При этом интенсивность процесса перекисного окисления с увеличением числа сеансов ГБО нарастала, что, в конечном счете, могло привести к бесконтрольной активации липидной перекисидации. В таких условиях возникает необходимость ограничивать количество сеансов ГБО, или использовать антиоксидантные препараты.

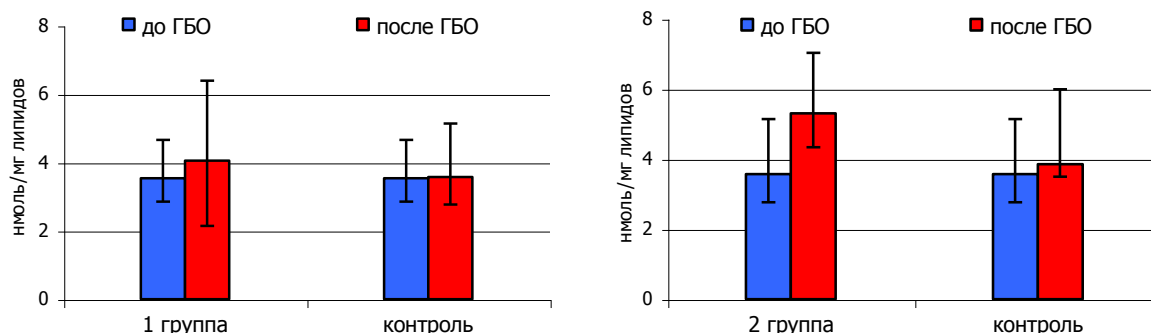


Рис. 1. Суммарное содержание продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови пациентов исследуемых групп

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров, Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.П. Арчаков. – М.: Медицина, 1972. – 252 с.
2. Голиков, С.Н. Общие механизмы токсического действия / С.Н. Голиков, И.В. Саночкин, Л.А. Тиунов. – Л.: Медицина, 1986. – 157 с.
3. Дубинина, Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса / Е.Е. Дубинина // *Вопр. мед. химии*. – 2001. – № 6. – С. 561-581.
4. Ефун, С.Н. Руководство по гипербарической оксигенации / С.Н. Ефун. – М.: Медицина, 1986. – 416 с.
5. Зборовская, И.А. Антиоксидантная система организма, ее значение в метаболизме. Клинические аспекты / И.А. Зборовская, М.В. Банникова // *Вестн. РАМН*. – 1995. – №6. – С. 53-60.
6. Зенков, Н.К. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньшикова // *Успехи совр. биологии*. – 1993. – №3. – С. 286-293.
7. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 62-68.
8. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1 / Y.A. Suh, R.S. Arnold, B. Lassegue et al. // *Nature*. – 1999. – N 401. – P. 79-82.
9. Fridovich, I. The trail to superoxide dismutase / I. Fridovich // *Protein Sci*. – 1998. – Vol. 7, N 12. – P. 2688-2690.
10. Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor / S.K. Park, J. Kim, Y. Seomun et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – Vol. 284, N 4. – P. 966-971.
11. Gamaley, I.A. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions / I.A. Gamaley, I.V. Klyubin // *Int. Rev. Cytol.* – 1999. – Vol. 188. – P. 203-255.
12. Kim, B.Y. Effects of reactive oxygen species on proliferation of Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells / B.Y. Kim, M.J. Han, A.S. Chung // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – Vol. 30, N 6. – P. 686-698.
13. Paper, I. The effect of oxidants on biomembranes and cellular metabolism / I. Paper // *Molec. Cell Biochemistry*. – 1989. – Vol. 91. – P. 149-157.
14. Rubanyi, G.M. Vascular effects of oxygen-derived free radicals / G.M. Rubanyi // *Free Radic. Biol. Med.* – 1988. – Vol. 4, N 2. – P. 107-120.

Рукопись поступила 25.12.03.