

УДК616.018.51+616.018.54]:541.515

И.А. НОВИКОВА, Ю. И. ЯРЕЦ

**ВЗАИМОСВЯЗЬ СТЕПЕНИ ОКИСЛЕННОСТИ ПЛАЗМЫ И ЭРИТРОЦИТОВ
В УСЛОВИЯХ АКТИВАЦИИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ**

Гомельский государственный медицинский университет, Беларусь

(Поступила в редакцию 04.09.2009)

Введение. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) является неспецифическим универсальным регулятором метаболических процессов в организме [13, 14]. Показано, что интермедиаты ПОЛ играют роль вторичных мессенджеров, обеспечивающих передачу сигналов через мембраны клеток, и участвуют в реализации компенсаторно-адаптационных реакций организма [6, 10, 17]. С другой стороны, чрезмерная активация ПОЛ может приводить к повреждению клеточных мембран и служить одной из причин возникновения и прогрессирования патологических состояний. Определение содержания продуктов липопероксидации в биологических материалах широко используется при исследовании патогенетических механизмов развития заболеваний [12, 16].

В клинической практике для оценки интенсивности ПОЛ обычно определяют один или несколько продуктов окислительных превращений гидроперекисей липидов: первичные - диеновые конъюгаты (ДК), вторичные - кетодиены, сопряженные триены (СТ) и малоновый диальдегид, конечные продукты липопероксидации - основания Шиффа (ОШ). В качестве биологического материала, как правило, используют плазму крови и/или эритроциты. Считается, что накопление продуктов ПОЛ в плазме и эритроцитах опосредовано выходом из зоны патологического процесса в различных тканях [2, 12, 15]. Однако имеются сообщения, что показатели ПОЛ мембран эритроцитов в большей степени отражают структурно-функциональное состояние самих эритроцитов, чем накопление продуктов липопероксидации в очаге поражения [4, И, 18]. Взаимосвязь между содержанием гидроперекисей липидов в плазме и эритроцитах при клинических состояниях, сопровождающихся активацией ПОЛ, не исследовалась.

Цель работы - изучить особенности распределения продуктов ПОЛ в плазме и эритроцитах в норме и в условиях активации свободнорадикального окисления.

В качестве модели активации свободнорадикального окисления выбрана локальная гранулирующая рана, возникшая случайным образом (в быту или на производстве) у практически здоровых людей среднего и молодого возраста, что позволяет исключить влияние других факторов, способных изменять содержание ПОЛ.

Материалы и методы исследования. Обследовано 80 больных (58 мужчин, 22 женщины в возрасте от 19 до 53 лет) с локальными гранулирующими ранами различных сроков давности (от 3 до 85 сут), госпитализированных в Гомельский областной центр термической травмы для оперативного лечения. Среди обследованных 53 человека имели локальные ожоги тела и конечностей II-III А-Б - IV степени, составлявшие от 0,3 до 8% от общей поверхности тела с площадью глубокого ожога от 0,07 до 4%. У 27 человек раны носили посттравматический или постнекротический характер. В зависимости от наличия клинических признаков готовности раны к оперативному восстановлению кожного покрова (отсутствие признаков воспаления, отсутствие выраженной экссудации, высокая адгезивность ран, наличие краевой эпителизации) вышеуказанным больным была проведена операция одномоментной аутодермопластики (АДП).

В качестве контрольной группы обследовано 40 здоровых доноров Гомельской областной станции переливания крови (28 мужчин и 12 женщин), сопоставимых по возрасту.

Материалом для исследования служила гепаринизированная венозная кровь. Содержание первичных (ДК), вторичных (СТ) и конечных (ОШ) продуктов ПОЛ в плазме и эритроцитах крови оценивали спектрофотометрически, отдельно регистрируя уровень липопероксидов в гептановой и изопропанольной фазах (отражает пероксидацию нейтральных жиров и фосфолипидов соответственно). Концентрацию эритроцитов в суспензиях контролировали фотометрически. Результаты выражали в единицах индексов окисления - E232/220 (содержание ДК), E278/220 (уровень СТ) и E400/220 (содержание ОШ) [5, 7]. Для удобства сопоставления уровня ПОЛ в плазме и эритроцитах рассчитывали индекс распределения (ИР) как отношение содержания ДК, СТ и ОШ в плазме к аналогичному показателю в эритроцитах (ДКп/ДКэ, СТп/СТэ, ОШп/ОШэ соответственно).

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ SPSS 13.0. С учетом результатов проверки на нормальность распределения применяли непараметрические методы статистики - критерий Манна-Уитни (для несвязанных выборок), критерий Вилкоксона (в связанных выборках). Для сравнения более двух выборок использовали модель однофакторного дисперсионного анализа. Характеристики распределения представляли в виде 25%-М-75%, где 25% - нижний квартиль; М - медиана; 75% - верхний квартиль [9].

Результаты и их обсуждение. Показатели липопероксидации плазмы и эритроцитов здоровых лиц и обследованных больных представлены в таблице.

Содержание продуктов ПОЛ в плазме и эритроцитах и значения ИР у больных с ранами и у здоровых лиц (25%-М-75%)

Определяемый параметр	Значения показателей (25%-М-75%)			
	Здоровые лица (n = 40)	ИР	Больные (n = 80)	ИР
<i>Показатели пероксидации нейтральных жиров (гептановая фаза)</i>				
ДКп	0,535–0,649–0,695	0,98–0,98–1	0,672–0,730–0,786*	0,94–0,98–1,05
ДКэ	0,565–0,644–0,698		0,678–0,718–0,765*	
СТп	0,097–0,100–0,110	0,93–0,95–0,97	0,160–0,210–0,236**(1)	0,71–0,84–0,95 ¹
СТэ	0,100–0,106–0,110		0,180–0,237–0,280*	
ОШп	0,015–0,021–0,023	0,94–0,96–1	0,016–0,020–0,023	0,92–0,94–0,95
ОШэ	0,016–0,021–0,024		0,017–0,021–0,025	
<i>Показатели пероксидации фосфолипидов (изопропанольная фаза)</i>				
ДКп	0,402–0,428–0,445	0,98–0,98–0,99	0,621–0,678–0,729**(1)	0,89–0,94–0,98 ¹
ДКэ	0,408–0,428–0,459		0,670–0,702–0,783*	
СТп	0,210–0,215–0,220	0,96–0,98–1	0,313–0,372–0,419**(1)	0,9–1,35–1,58 ¹
СТэ	0,210–0,218–0,223		0,262–0,291–0,325*	
ОШп	0,018–0,021–0,030	0,75–0,8–1	0,039–0,055–0,078**(1)	0,52–0,7–0,82 ¹
ОШэ	0,019–0,024–0,035		0,055–0,068–0,111*	

Примечание. Достоверность различий: * – в содержании продуктов ПОЛ между больными и здоровыми лицами ($P < 0,05$); ** – между соответствующими показателями плазмы и эритроцитов; ¹ – в значениях ИР между больными и здоровыми лицами ($P < 0,05$).

Как видно из таблицы, у здоровых лиц интенсивность липопероксидации в плазме и эритроцитах практически одинакова (ИР по всем показателям, кроме ОШ в изопропанольной фазе, колебался от 0,94 до 1,0). У больных с локальными ранами по сравнению со здоровыми лицами интенсивность липопероксидации в целом увеличивалась, что отражалось в повышении содержания продуктов ПОЛ как в плазме, так и в эритроцитах ($P < 0,001$, $P < 0,01$). Исключение составило лишь содержание ОШ в гептановой фазе плазмы и эритроцитов, которое не отличалось от контрольных значений. Одновременно у больных наблюдался выраженный дисбаланс относительно содержания продуктов пероксидации фосфолипидов в плазме и эритроцитах ($P < 0,001$), тогда как различия в распределении нейтральных липопероксидов отмечены только для СТ ($P = 0,006$). Снижение ИР ДКп/ДКэ и ОШп/ОШэ у больных по сравнению со здоровыми лицами происходило за счет увеличения окисленности мембран эритроцитов (соответственно 0,89-0,94-0,98 и 0,52-0,7-0,82 у больных и 0,98-0,98-0,99 и 0,75-0,8-1 у здоровых лиц, $P < 0,01$). Индекс распределения СТп/СТэ, на-

против, увеличивался за счет значительного превалирования СТ в плазме по сравнению с эритроцитами (0,9-1,35-1,58 у больных по сравнению с 0,98-0,98-0,99 у доноров, $P < 0,001$).

Учитывая, что наиболее выраженные диспропорции между параметрами липопероксидации плазма/эритроциты были выявлены для СТ и ОШ в изопропанольной фазе, нами проанализированы особенности этих показателей в зависимости от срока давности раны, а также от характера течения послеоперационного периода у больных (наличие или отсутствие лизиса аутодермотрансплантата).

По срокам давности ран пациенты были разделены на несколько групп на основании критериев, приведенных Ю. К. Абаевым и Б. А. Парамоновым [1, 8]. Первая группа (17 человек) - больные со свежими ранами, которым проводилась «ранняя» АДП (до 7 сут от момента получения травмы), вторая группа (56 человек) - пациенты с острыми ранами (от 7 сут до 2 мес. от момента получения травмы) и третья группа (7 человек) - с хроническими ранами (от 2 мес. до 85 сут). Анализ с использованием однофакторного дисперсионного метода показал, что по всем изученным интер-медиатам ПОЛ индексы соотношения плазма/эритроциты значимо не различались между сравниваемыми группами. Так, в первой, второй и третьей группах ИР для СТ составил 1,2-1,35-1,5; 0,9-1,4-1,6 и 0,84-1,2-1,44; для ОШ - 0,41-0,72-0,82; 0,56-0,72-0,82 и 0,56-0,58-0,6 соответственно.

Как указывалось выше, у всех больных, вошедших в данное исследование, отмечалась клиническая готовность раны к операции (отсутствие признаков воспаления, отсутствие выраженной экссудации, высокая адгезивность ран, а также наличие краевой эпителизации для острых и хронических ран). Поэтому им была проведена операция аутодермопластики, которая у 54 больных завершилась приживлением трансплантата на 7-9-е сутки (первая группа), а у 26 больных в эти же сроки произошел частичный или полный лизис лоскута (вторая группа). Сравнимые группы не различались по половозрастному признаку, давности получения раны и ее этиологии. Сравнительный анализ параметров липопероксидации показал, что у пациентов первой группы уровень СТ в плазме в дооперационном периоде значительно превалировал над аналогичным показателем у больных второй группы (ИР 1,26-1,47-1,6 и 0,83-0,87-1,4 соответственно, $P = 0,0003$). Индексы распределения ОШп/ОШэ практически не различались (0,52-0,76-0,89 для первой группы, 0,52-0,66-0,76 для второй группы, $P = 0,09$), и вне зависимости от исхода операции интенсивность накопления конечных продуктов ПОЛ в эритроцитах была всегда выше, чем в плазме.

Таким образом, дооперационные значения индекса распределения вторичных продуктов ПОЛ (сопряженные триены) между плазмой и эритроцитами могут иметь прогностическое значение при оценке риска отторжения кожного аутодермотрансплантата у больных с локальными ранами. Можно предположить, что превалирование уровня СТ в плазме над аналогичным показателем в мембранах эритроцитов при интенсификации процессов липопероксидации в организме является отражением степени устойчивости мембраны эритроцитов к окислительному стрессу. Срыв механизмов такой устойчивости (в результате несостоятельности антиоксидантной защиты либо по причине нарушений функциональной резистентности эритроцитов) свидетельствует о недостатке компенсаторно-адаптационных возможностей организма и может рассматриваться как признак неблагоприятного исхода патологического процесса.

Динамика показателей ПОЛ в течение послеоперационного периода у больных сравниваемых групп также различалась (рис. 1). У больных первой группы на 3-4-е сутки происходило равномерное снижение содержания СТ в изопропанольной фазе плазмы и эритроцитов, за счет чего ИР СТп/СТэ сохранялся на уровне дооперационных значений (1,3-1,4-1,53). На 7-9-е сутки наблюдалось снижение ИР по сравнению с его дооперационным уровнем ($P < 0,0001$), значения которого приближались к показателям здоровых лиц. Соотношение ОШп/ОШэ практически нормализовалось (достигло значений, характерных для здоровых лиц) уже на 3-4-е сутки.

У больных с лизисом кожного аутодермотрансплантата (вторая группа) исходно сниженный индекс распределения СТп/СТэ продолжал снижаться ($P < 0,01$) по сравнению с дооперационными значениями за счет преимущественного увеличения содержания СТ в эритроцитах. Кроме того, на фоне лизиса лоскута происходило дальнейшее увеличение концентрации ОШ в изопропанольной фазе как экстракта плазмы, так и эритроцитов, однако в плазме в несколько большей степени. В результате ИР ОШп/ОШэ увеличился по сравнению с дооперационными значениями ($P < 0,001$) (рис. 2).

Таким образом, полученные результаты показывают, что наиболее выраженные и клинически информативные изменения соотношения показателей окисленности плазма/эритроциты у обследованных больных наблюдались по содержанию СТ в изопропанольной фазе, которые, как известно, являются вторичными продуктами окисления фосфолипидов [3, 5].

Интересная закономерность выявлена нами при анализе взаимосвязей между показателями окисленности плазмы и мембран эритроцитов (по содержанию СТ и ОШ). В контрольной группе взаимосвязей между уровнем СТ фосфолипидов плазмы и СТ фосфолипидов эритроцитов не выявлено, но отмечалась сильная прямая связь между содержанием ОШ в плазме и эритроцитах ($r=0,8$; $P = 0,0003$). На фоне активации свободнорадикального окисления у обследованных нами больных наличие взаимосвязи между содержанием СТ в фосфолипидах плазмы и эритроцитов зависело от значений ИР СТп/СТэ. При величине индекса СТп/СТэ > 1 (содержание сопряженных триенов в плазме выше, чем в эритроцитах) корреляций не выявлено. При величине индекса СТп/СТэ < 1 (содержание сопряженных триенов в плазме ниже, чем в эритроцитах) появлялась сильная прямая взаимосвязь между содержанием СТ в изопропанольной фазе плазмы и эритроцитов ($r = 0,77$; $P = 0,00008$). Между содержанием ОШ в плазме и эритроцитах у обследованных больных выявлены корреляции, аналогичные таковым в контрольной группе ($r = 0,7$; $P = 0,0007$).

Таким образом, в условиях активации процессов ПОЛ (в рассмотренном случае – при локальной гранулирующей ране) начинают проявляться различия в накоплении продуктов ПОЛ между плазмой и эритроцитами, тогда как у здоровых лиц степень окисленности плазмы и эритроцитов в целом одинаковая. В наибольшей степени различия проявляются по показателям содержания вторичных и конечных продуктов окисления фосфолипидов - СТ и ОШ. Эти данные указывают, что выбор биоматериала и исследуемых параметров при изучении процессов липопероксидации в организме не должен быть случайным, а также объясняют значительную противоречивость результатов, полученных разными авторами.

Выводы

1. У здоровых лиц в условиях отсутствия активации свободнорадикального окисления содержание продуктов липопероксидации в плазме соответствует таковому в эритроцитах.
2. На фоне активации процессов липопероксидации (пациенты с локальными гранулирующими ранами) содержание вторичных продуктов окисления фосфолипидов (сопряженные триены) превалирует в плазме крови, а конечных продуктов - в мембранах эритроцитов.
3. Дооперационные значения индекса распределения вторичных продуктов ПОЛ (сопряженные триены) между плазмой и эритроцитами (сопряженные триены плазмы/ сопряженные триены

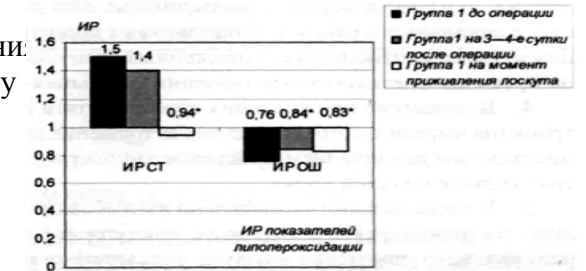


Рис. 1. Изменение ИР у пациентов первой группы в динамике послеоперационного периода. На рисунке приведены значения медианы. * – значимые различия в значениях ИР в послеоперационном периоде по сравнению с дооперационным состоянием

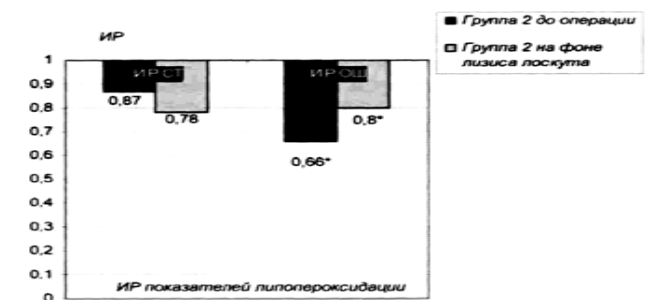


Рис. 2. Изменение ИР у пациентов второй группы в динамике послеоперационного периода. На рисунке приведены значения медианы. * – значимые различия в значениях ИР в послеоперационном периоде по сравнению с дооперационным состоянием

эритроцитов) могут служить фактором прогноза риска отторжения аутодермотрансплантата у больных с локальными ранами. У пациентов с хорошим исходом оперативного вмешательства значения индекса соотношения сопряженных триенов в плазме и эритроцитах до операции достоверно превышали аналогичные значения у больных с отторжением кожного лоскута.

4. В динамике приживления трансплантата показатели степени окисленности плазмы и эритроцитов выравниваются, тогда как отторжение аутодермотрансплантата сопровождается преимущественным накоплением продуктов липопероксидации (сопряженные триены) в эритроцитах по сравнению с плазмой крови.
5. У здоровых лиц не выявлено взаимосвязи между уровнем сопряженных триенов в фосфолипиды плазмы и аналогичным показателем в эритроцитах. На фоне активации свободно-радикального окисления наличие указанной связи зависит от значений индекса распределения сопряженных триенов между плазмой и эритроцитами: сильная прямая корреляция появляется при величине индекса менее 1.

Литература

1. Абаев Ю. К. // Мед. новости. 2006. № 6. С. 34-40.
2. Аношина М. Ю. // Укр. мед. журн. 2006. Т. 56, № 6. С. 78-82.
3. Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения). М., 1989.
4. Васильева Е. М. // Биомед. химия. 2005. Т. 51. Вып. 2. С. 118-126.
5. Волчегорский И. А. // Вопр. мед. химии. 1989. Т. 35, № 1. С. 127-135.
6. Дубинина Е. Е. // Вопр. мед. химии. 2001. № 6. С. 561-581.
7. Львовская Е. И. // Вопр. мед. химии. 1991. Т. 37, № 4. С. 93.
8. Парамонов Б. А. Ожоги: руководство для врачей. СПб., 2000.
9. Платошов А. Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М, 2000.
10. Рябинин В. Е., Лифшиц Р. И. // Вопр. мед. химии. 1990. № 1. С. 7-13.
11. Сторожук П. Г. // Вестн. интенсив. терапии. 1998. № 4. С. 17-21.
12. Шанин Ю. И., Шанин В. Ю., Зиновьев Е. В. Антиоксидантная терапия в клинической практике (теоретическое обоснование и стратегия проведения). СПб., 2003.
13. Aguoma O. I. // J. Amer. Oil. Chem. Soc. 1998. Vol. 75. P. 199-212.
14. Gross M. D. // Ann. Intern. Med. 1987. Vol. 107. P. 526-545.
15. Hiroto Y., Shima S., Shimizu Y. // Burns. 1988. Vol. 14, N 4. P. 313-319.
16. Nishigaki J., Nagihara M., Hiratsuka M. et al. // Biochem. Med. 1980. Vol. 24. P. 185-189.
17. Vivekananda J., Lin A., Coalson J. J., King R. J. // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269, N 40. P. 25057-25061.
18. Zaugg R. H., Walder J. A., Klotz M. // The J. of Biol. Chem. 1977. Vol. 252. N 23. P. 8542-8548.

I. A. NOVIKOVA, Y. I. YARETS

CORRELATION BETWEEN THE OXIDATION DEGREE OF PLASMA AND ERYTHROCYTES
IN THE CONDITIONS OF FREE RADICAL OXIDATION
ACTIVATION
Gomel State Medical University, Belarus

Summary

We studied the peculiarities of lipid peroxidation products distribution between plasma and erythrocytes in the normal conditions and in the conditions of free radical oxidation activation by the local granulated wound example. Significant differences in the lipoperoxide accumulation between plasma and erythrocytes were found statistically when lipid peroxidation was intensified while in the healthy individuals it was identical. Most of the significant differences were established for the content of the intermediate and end products of phospholipids peroxidation-trien conjugates and Schiff bases. We analyzed the correlations between the indices of plasma and erythrocytes oxidation and its course of the patients with different post-procedural period outcome.