

УДК 616 – 092.9; 616.71 – 001.5

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТРАВМЕ ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНОГО АППАРАТА

¹Кураян К.М., ²Березовский Д.П., ^{2,3}Фалеева Т.Г., ^{3,4}Корниенко И.В.

¹ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, e-mail: Kristi-rostov@mail.ru;

²Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону,
e-mail: dpb@mail.ru;

³ФГКУ «16 Государственный центр судебно-медицинских
и криминалистических экспертиз» МО РФ, Ростов-на-Дону;

⁴Научно-исследовательский институт биологии Южного федерального университета,
Ростов-на-Дону, e-mail: ikornienko@yandex.ru

Проведено исследование интенсивности свободно-радикального окисления липидов (диеновых конъюгатов (ДК), шиффовых оснований (ШО) и активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы) в гемолизате и плазме крови крыс при травме опорно-двигательного аппарата. Установлено, что на первые сутки после сформированного перелома происходит значительное увеличение содержания продуктов ПОЛ (ДК и ШО) на фоне активации ключевых ферментов антиоксидантной защиты (каталазы и СОД), что позволяет сделать вывод о формировании окислительного стресса через сутки после сформированного перелома. Через две недели после формирования перелома содержание ДК и ШО не только нормализуется, но и снижается по отношению к контрольной группе животных, что связано, вероятно, с мобилизацией антиоксидантной системы организма.

Ключевые слова: травма, перекисное окисление липидов (ПОЛ), диеновые конъюгаты (ДК), шиффовые основания (ШО), супероксиддисмутаза (СОД), каталаза

EVOLUTION OF THE LIPID PEROXIDATION FACTORS BY THE EXPERIMENTAL INJURY OF LOCOMOTOR SYSTEM

¹Kurayan K.M., ²Berezovskiy D.P., ^{2,3}Faleeva T.G., ^{3,4}Kornienko I.V.

¹Southern federal university, Rostov-on-Don, e-mail: Kristi-rostov@mail.ru;

²Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, e-mail: dpb@mail.ru;

³16 State Center of Forensic Medicine and Criminalistical Investigations, Rostov-on-Don;

⁴Research biology institute of South Federal University, Rostov-on-Don, e-mail: ikornienko@yandex.ru

We studied the rate of diene conjugates, schiff bases, superoxide dismutase and catalase by injury in haemolysatum and (blood) plasma of locomotor system on test animal in the experimental conditions. There was significant increase of LP products (DC and SB) and the activation of key antioxidative enzymes during the first twenty-four hours after the generated fracture, which gives us an opportunity to conclude about the presence of oxidative stress through a day after the generated fracture. In two weeks after the generated fracture the contents of the LP products (DC and SB) are reduced in relation to control animals group, which is probably connected to the mobilization of the antioxidative organism system.

Keywords: injury, lipid peroxidation (LP), diene conjugates (DC), schiff bases (SB), superoxide dismutase (SOD), catalase

В практике судебно-медицинского эксперта одним из актуальных вопросов в помощи правоохранительным органам является установление давности причинения механической травмы. Для решения данного вопроса в настоящее время существуют, как правило, только морфологические маркеры. Суть данных методов сводится к оценке процессов воспаления гистологическими методами [2]. Из биохимических же методов активно применяется определение концентрации метгемоглобина в гематомах. Однако данный метод абсолютно не приемлем при отсутствии данного патологического очага.

Механическая травма однозначно приводит к воспалительной реакции в организме [4], что не может не сказаться на со-

стоянии перекисного окисления липидов (ПОЛ) – раннего маркера воспалительного процесса [5]. Однако в доступной научной литературе нами не обнаружено сведений, свидетельствующих о процессе перекисного окисления липидов при механической травме. Поэтому целью настоящей работы явилось исследование интенсивности свободно-радикального окисления липидов при механической травме для оценки возможности решения одной из актуальных задач судебно-медицинской экспертизы – установления давности причинения механических повреждений.

Материал и методы исследования

В качестве экспериментальных животных использовались беспородные крысы (самцы) массой 250–300 г. Животные содержались в стандартных

клетках в условиях 12-часового режима освещения и свободного доступа к корму и воде. Содержание животных соответствовало санитарным правилам, утвержденным МЗ СССР 06.07.73 г., по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Кормили животных натуральными и брикетированными кормами в соответствии с нормами, утвержденными приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г. Перед началом эксперимента животные проходили карантин и акклиматизацию в условиях вивария в течение 10 дней.

Животные были рандомизированы в одну из трех групп по 16 особей в каждой (всего 48 животных).

I группа (контроль) – контрольная (интактные животные).

II группа (опытная группа) – животные, которым формировали закрытый перелом костей голени и через сутки выводили из эксперимента.

III группа (опытная группа) – животные, которым формировали закрытый перелом костей голени и выводили из эксперимента через 2 недели.

Биохимические показатели оценивали в плазме крови и гемолизате.

Содержание продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК) и шиффовых оснований (ШО) определяли методами [7, 8]. Также определяли концентрацию гемоглобина в гемолизате, общих липидов [9], общего

белка [10], активность ферментов: супероксиддисмутазы (СОД) и супероксидустраняющей активности (СУА) [6], каталазы [1].

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов прикладных программ «Microsoft Office 2007» (MS Excel 2007) и «Биостатистика» (версия 4.03).

Оценку соответствия типа распределения выборки нормальному проводили с использованием метода «трех сигм». Для каждой серии опытов рассчитывали медиану, процентиля (25; 75 – нижнюю и верхнюю квартиль).

В случаях ненормального распределения для оценки статистически значимых различий между сравниваемыми группами использовали непараметрический двухвыборочный критерий Манна–Уитни при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Содержание ДК в плазме крови опытных животных через сутки после сформированного перелома увеличивалось почти в 4 раза, в то время как спустя 2 недели данный показатель был снижен на 41% (табл. 1).

Таблица 1

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в крови крыс при экспериментальной травме опорно-двигательного аппарата

Группы животных		I	II	III	I	II	III
Исследуемое соединение		В гемолизате			В плазме		
Диеновые конъюгаты, нмоль/мг липида	Нормальность по 3σ	No norm	Norm	Norm	No norm	Norm	No norm
	Медиана	9,28	14,76	7,06	4,90	19,28*	2,89*
	25 процентиля	4,24	8,86	5,51	3,13	13,81	2,54
	75 процентиля	11,96	25,16	12,36	5,86	31,66	2,99
	$U_{кр} p \leq 0,05$		не достоверно	не достоверно		31	81
	$\Delta\%$		59	-24		294*	-41*
Шиффовые основания, условные единицы/мг липида	Нормальность по 3σ	Norm	Norm	Norm	No norm	No norm	No norm
	Медиана	13,00	58,24*	13,79	3,95	24,88*	2,53*
	25 процентиля	3,96	24,39	6,59	2,95	17,01	2,27
	75 процентиля	26,49	79,24	18,61	4,82	36,36	3,38
	$U_{кр} p \leq 0,05$		31	не достоверно		31	81
	$\Delta\%$		348*	6		530*	-36*

Примечание: * $p \leq 0,05$ – относительно контрольной группы.

Аналогичная динамика была выявлена и для ШО в плазме крови. Во II группе животных наблюдали увеличение данного показателя на 530%, а в III группе животных снижение на 36% соответственно (табл. 1).

Содержание ШО в гемолизате опытных животных через сутки после сформированного перелома увеличивалось на 348% (табл. 1).

Достоверных отличий изменения активности СОД в гемолизате животных

в экспериментальных группах по отношению к контролю не было выявлено. В то время как в плазме крови животных

II группы отмечали повышение супероксидустраняющей активности на 135% (табл. 2).

Таблица 2

Изменение активности ферментов-антиоксидантов в крови крыс при экспериментальной травме опорно-двигательного аппарата

Группы животных		I	II	III	I	II	III
Исследуемое соединение		В гемолизате			В плазме		
Активность супероксиддисмутазы, условные единицы/мг гемоглобина (или условные единицы / мг белка)	Нормальность по 3σ	Norm	Norm	Norm	No norm	norm	No norm
	Медиана	1,21	1,64	1,05	0,2	0,47*	0,34
	25 процентиль	0,62	1,36	0,85	0,07	0,44	0,15
	75 процентиль	1,60	1,96	2,10	0,40	0,51	0,49
	$U_{кр} p \leq 0,05$		не достоверно	не достоверно		24	не достоверно
	Δ%		35	-13		135*	70
Активность каталазы, нмоль перекиси водорода/мг гемоглобина (нмоль перекиси водорода /мг белка)	Нормальность по 3σ	No norm	Norm	No norm	No norm	No norm	Norm
	Медиана	87	144,77*	100,99	3,81	6,15	4,17
	25 процентиль	76,62	135,79	97,86	1,25	5,57	1,93
	75 процентиль	113,11	146,77	106,22	6,26	6,63	5,10
	$U_{кр} p \leq 0,05$		31	не достоверно		не достоверно	не достоверно
	Δ%		66*	16		61	9

Примечание: * $p \leq 0,05$ – относительно контрольной группы.

Изменение активности каталазы наблюдали только в гемолизате II группы животных. Активность фермента увеличилась на 66% (табл. 2).

Полученные результаты показали, что на первые сутки после сформированного перелома происходит значительное увеличение продуктов ПОЛ (ДК и ШО) на фоне активации ключевых ферментов антиоксидантной защиты (каталазы и супероксидустраняющей активности). Это позволяет нам судить о формировании окислительного стресса через сутки после сформированного перелома.

Стоит заметить, что каталаза принадлежит к классу ферментов, активность которых увеличивается только в присутствии высоких концентраций перекиси водорода [3].

Через две недели после формирования перелома содержание продуктов ПОЛ (ДК и ШО) не только нормализуется, но и снижается по отношению к контрольной группе животных. Таким образом, мобилизация антиоксидантной системы организма приводит к нормализации свободнорадикального окисления липидов.

Заключение

Таким образом, полученные результаты позволяют прийти к выводу о возможности использования сведений о концентрации продуктов ПОЛ (ДК и ШО) для экспертного решения вопроса об установлении давности причинения механических повреждений. В дальнейшем предполагается детально проследить динамику развития окислительного стресса с последующим изучением этих показателей у лиц с травматической болезнью.

Список литературы

1. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
2. Крюков В.Н., Саркисян Б.А., Янковский В.Э. Диагностикум причин смерти при механических повреждениях. Причины смерти при механических повреждениях. Том 7. – Новосибирск: Наука, 2001. – 142 с.
3. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / В.З. Ланкин, Н.К. Зенков, И.А. Бондарь, Н.Ф. Круговых, В.А. Труфакин. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.
4. Политравма / под ред. Е.К. Гуманенко, В.К. Козлова. – М.: ГЭОТАР-М, 2009. – 608 с.

5. Острофазовый ответ и биотрансформационная активность печени после операций на открытом сердце / Г.И. Сергеева, Л.Г. Князькова, Т.А. Могутнова, В.А. Непомнящих, В.В. Ломиворотов, М.Н. Дерягин, М.А. Новиков, А.А. Ефимов, С.С. Михайлов // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2006. – С. 31–35.

6. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопросы медицинской химии. – 1999. – № 3. – С. 14–15.

7. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 63–64.

8. Bidlack W.R., Tappel A.T. Fluorescent products of phospholipids during lipid peroxidation// *Lipids*. – 1973. – Vol. 8. – № 4. – P. 203–209.

9. Bligh E., Dyer W. Rapid method of lipids extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* – 1959. – Vol. 37. – № 8. – P. 203–209.

10. Lowry O.H. et. al. Protein measurement with the Folin phenol reagent// *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.

References

1. Korolyuk M.A., Ivanova L.T., Mayorova I.G. *Laboratornoe delo*, 1998, no. 1, pp. 16–19.

2. Kryukov V.N., Sarkisyan B.A., Yankovskiy V.E. *Prichiny smerti pri mekhanicheskikh povrezhdeniyakh*. T.7. Novosibirsk, Nauka, 2001, 142 p.

3. Menschikova E.B. *Okislitelnyy stress. Prooksidanty I antioksidanty*. Moscow, Firma «Slovo», 2006, 556 p.

4. *Politravma*. Moscow, GEOTAR M, 2009, 608 p.

5. Sergeeva G. I., Knyazkova L.G., Mogutnova T.A., Nepomnyaschikh V.A., Lomivorotov V.V., Deryagin M.N., Novikov M.A., Efimov A.A., Mikhaylov S.S. *Patologiya krovoobrascheniya I kardiokhirurgiya*, 2006, pp. 31–36.

6. Sirota T.V. *Voprosy meditsinskoj khimii*, 1999, no. 3, pp. 14–15.

7. Stalnaya I.D. *Sovremennye metody v biokhimii*. Moscow, Meditsina, 1977, pp. 63–64.

8. Bidlack W.R., Tappel A.T. *Fluorescent products of phospholipids during lipid peroxidation*// *Lipids*. 1973. Vol. 8. no.4. pp. 203–209.

9. Bligh E., Dyer W. *Rapid method of lipids extraction and purification* // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959. Vol. 37. no. 8. pp. 203–209.

10. Lowry O.H. et. al. *Protein measurement with the Folin phenol reagent* // *J. Biol. Chem.* 1951. v. 193. pp. 265–275.

Рецензенты:

Бондаренко Т.И., д.б.н., профессор кафедры биохимии и микробиологии ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону;

Шкурат Т.П., д.б.н., профессор кафедры генетики ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», директор Научно-исследовательского института биологии ЮФУ, г. Ростов-на-Дону.

Работа поступила в редакцию 07.11.2012.