

УДК 616.71-001.5-092.9:612.017

## СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ В УСЛОВИЯХ МНОЖЕСТВЕННОЙ СКЕЛЕТНОЙ ТРАВМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

<sup>1,2</sup>Бочаров С.Н., <sup>2</sup>Кулинский В.И., <sup>1</sup>Лебедь М.Л., <sup>1</sup>Кирпиченко М.Г.,  
<sup>2</sup>Гуманенко В.В., <sup>2</sup>Бахтаирова В.И., <sup>2</sup>Булавинцева О.А., <sup>2</sup>Егорова И.Э.,  
<sup>2</sup>Жолесниченко Л.С., <sup>2</sup>Леонова З.А., <sup>2</sup>Суслова А.И., <sup>2</sup>Ясько М.В., <sup>1</sup>Лепехова С.А.,  
<sup>1</sup>Родионова Л.В., <sup>1</sup>Кинаш И.Н.

<sup>1</sup>ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН,  
Иркутск, e-mail: bocharov@irk.ru;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет  
Минздрава России», Иркутск

Развитие системного воспалительного ответа при политравме не зависит от локализации и тяжести первичного повреждения. Активные формы кислорода, провоспалительные цитокины и липидные гормоны вызывают и поддерживают воспаление и оксидативный стресс, при этом оба фактора стимулируют друг друга по принципу порочного круга. Система глутатиона имеет ключевое значение в антиоксидантной защите организма млекопитающих и, таким образом, рассматривается как критический фактор развития воспаления и иммунных ответов. В эксперименте на 20 кроликах породы Шиншилла через 7 дней после множественной скелетной травмы обнаружены признаки системного ответа на воспаление и связанного с ним оксидативного стресса. В сердце и лёгких лабораторных животных выявлен дисбаланс компонентов системы глутатиона. Содержание восстановленного глутатиона в печени и лёгких не изменялось.

**Ключевые слова:** система глутатиона, внутренние органы, множественная скелетная травма, системный воспалительный ответ, оксидативный стресс

## GLUTATHIONE SYSTEM OF INTERNAL ORGANS IN THE PRESENCE OF MULTIPLE SKELETAL TRAUMA IN EXPERIMENT

<sup>1,2</sup>Bocharov S.N., <sup>2</sup>Kulinskiy V.I., <sup>1</sup>Lebed M.L., <sup>1</sup>Kirpichenko M.G., <sup>2</sup>Gumanenko V.V.,  
<sup>2</sup>Bakhtairova V.I., <sup>2</sup>Bulavintseva O.A., <sup>2</sup>Yegorova I.E., <sup>2</sup>Kolesnichenko L.S., <sup>2</sup>Leonova Z.A.,  
<sup>2</sup>Suslova A.I., <sup>2</sup>Yasko M.V., <sup>1</sup>Lepekhova S.A., <sup>1</sup>Rodionova L.V., <sup>1</sup>Kinash I.N.

<sup>1</sup>Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS, Irkutsk, e-mail: bocharov@irk.ru;

<sup>2</sup>Irkutsk State Medical University, Irkutsk

Development of inflammatory response in the presence of polytrauma does not depend on localization and severity of initial injury. Reactive oxygen species, proinflammatory cytokines and lipid hormones induce and sustain inflammation and oxidative stress; both factors stimulate each other under the principle of vicious circle. Glutathione system is of key significance for mammals' antioxidant organism protection, and hence it is considered as a critical factor of development of inflammation and immune responses. In experiment on 20 Chinchilla rabbits 7 days after multiple skeletal trauma we revealed marks of bodily response to inflammation and oxidative stress, connected with it. In heart and lungs of laboratory animals we determined disbalance of glutathione system components. Content of reduced glutathione in liver and lungs did not changed.

**Keywords:** glutathione system, internal organs, multiple skeletal trauma, systemic inflammation response, oxidative stress

Политравма является постоянным компонентом травматизма с высокой летальностью (до 36–38%) [1]. Развитие системного воспалительного ответа (СВО) при политравме не зависит от локализации и тяжести первичного повреждения и оценивается как неспецифическая защитная реакция организма [8]. Составной частью СВО является оксидативный стресс, причиной которого является образование и секреция полиморфноядерными лейкоцитами активных форм кислорода (АФК), одного из важнейших гуморальных агентов вторичной альтерации [4, 9]. АФК считают интегральной частью воспалительного ответа [7]. Тесная связь оксидативного

стресса, воспаления и иммунных ответов общепризнана. АФК, провоспалительные цитокины (ТНФ- $\alpha$ , интерферон- $\gamma$ , интерлейкин-1 и др.) и липидные гормоны (эйкозаноиды) вызывают и поддерживают воспаление и оксидативный стресс, при этом оба фактора стимулируют друг друга по принципу порочного круга [7]. Активные формы кислорода повреждают структуру ДНК, белков и различные мембранные структуры клеток [2, 6]. Система глутатиона имеет ключевое значение в антиоксидантной защите организма млекопитающих и, таким образом, рассматривается как критический фактор развития воспаления и иммунных ответов [7].

## Материалы и методы исследования

Объектом исследования были 20 кроликов породы Шиншилла мужского пола в возрасте от 6 до 12 месяцев. Все манипуляции с животными производились на базе вивария научного отдела экспериментальной хирургии ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН, были одобрены этическим комитетом ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН и соответствовали «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» и «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях». Контрольную группу составили 10 интактных лабораторных животных, у которых сначала получали образцы крови, а после эвтаназии путем внутривенного введения раствора хлорида калия на фоне барбитуровой седации производили забор образцов внутренних органов – сердца, лёгких, печени и почек. Исследование компонентов системы глутатиона выполняли в биохимической лаборатории на базе кафедры биохимии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет Минздрава России». В образцах внутренних органов определяли содержание восстановленного глутатиона [10] и трёх ферментов: глутатионредуктазы [14], глутатионтрансферазы [13] и глутатионпероксидазы [12]. Образцы плазмы крови подвергались реакции с тиобарбитуровой кислотой (использовали реактив «ТБК-агат») для подтверждения выраженности оксидативного стресса. В клинической лаборатории ФГБУ «НЦРВХ» СО РАМН исследовали образцы цельной крови для определения количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы. Лейкоцитарный индекс интоксикации рассчитывали по формуле Кальф-Калифа Я.Я. (1941) [5]:

$$\text{ЛИИ} = (С+2П+3Ю+4Ми) \times (Пл+1) / ((Мо+Ли) \times (\mathcal{E}+1)),$$

где С – сегментоядерные нейтрофилы, П – палочкоядерные, Ю – юные, Ми – миелоциты, Пл – плазматические клетки, Мо – моноциты, Ли – лимфоциты, Э – эозинофилы.

Полученные в контрольной группе данные мы использовали в качестве референсных значений, поскольку в доступной литературе нам не удалось обнаружить сообщения о диапазоне нормальных величин содержания компонентов системы глутатиона во внутренних органах кроликов. 10 кроликам основной группы после взятия образцов крови в условиях общей анестезии выполняли оперативное вмешательство: стабилизацию костей правого предплечья и левой голени спицевым аппаратом внешней фиксации из 2-х подсистем с последующей остеотомией костей соответствующих сегментов в средней трети. Стандартное послеоперационное лечение включало внутримышечное обезболивание анальгином в дозе 400–500 мг/кг/сутки в течение 5 дней после операции, антибиотикопрофилактику линкомицином 50–70 мг/кг/сутки и инфузионную терапию раствором глюкозы 5% в дозе 50–60 мл/кг/сутки в течение 3 дней после операции. Через 7 дней после операции кроликам основной группы производили забор образцов крови и внутренних органов аналогично тому, как это делалось в контрольной группе. Статистическая обработка данных проводилась методами описательной статистики и сравнения выборок (U-критерий Манна-Уитни). Уровень статистической значимости принят равным 0,05. Обработка данных проводилась с использованием программы R (версия 2.13.1.) Ре-

зультаты исследования представлены в виде медианы (Me), 25<sup>я</sup> и 75<sup>я</sup> перцентилей (P<sub>25</sub> и P<sub>75</sub>).

## Результаты исследования и их обсуждение

Диагностика синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) основана на регистрации отклонений нескольких клинических и лабораторных показателей за рамки нормального диапазона значений [11]. Очевидно, что известные границы критериев ССВО корректны только применительно к клиническим наблюдениям. Поэтому при описании результатов эксперимента мы использовали термин «системный воспалительный ответ», для иллюстрации которого применяли динамику показателей общего количества лейкоцитов в периферической крови, доли незрелых форм в лейкоцитарной формуле, а также лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИИ).

Исходно все три названных показателя – общего количества лейкоцитов, доли незрелых форм лейкоцитов и ЛИИ – у кроликов основной группы не имели значимых отличий от аналогичных показателей, полученных в контрольной группе. А в условиях множественной скелетной травмы у лабораторных животных основной группы был зарегистрирован рост показателей, характеризующих СВО.

На седьмые сутки после операционной травмы показатель количества лейкоцитов в периферической крови статистически достоверно (p = 0,014) увеличивался с дооперационного уровня 4,85 (3,4; 6,75) × 10<sup>12</sup>/л до 10,8 (8,85; 16,35) × 10<sup>12</sup>/л. Помимо увеличения общего количества лейкоцитов в периферической крови, у лабораторных животных основной группы в послеоперационном периоде изменялся качественный состав лейкоцитов, о чём свидетельствует повышение доли молодых незрелых форм лейкоцитов в лейкоцитарной формуле. Если исходно незрелые формы составляли 1,0 (1,0; 2,0)% от общего количества лейкоцитов, то к седьмым суткам после операционной травмы значение показателя статистически достоверно (p = 0,001) возрастало до 7,5 (6,0; 8,8)%.

Изменения лейкоцитарного индекса интоксикации у кроликов основной группы в условиях множественной скелетной травмы также свидетельствовало в пользу формирования СВО (рис. 1). Несмотря на то, что ЛИИ был предложен ещё в первой половине XX века, показатель и в настоящее время сохраняет практическую актуальность. Так, проведённое уже в XXI веке клиническое исследование подтвердило способность ЛИИ отражать тяжесть состояния и выраженность

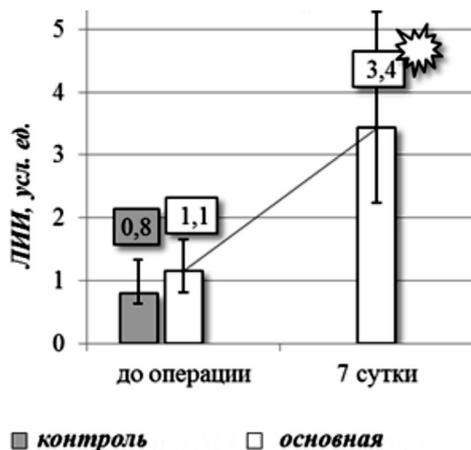


Рис. 1. Лейкоцитарный индекс интоксикации у кроликов

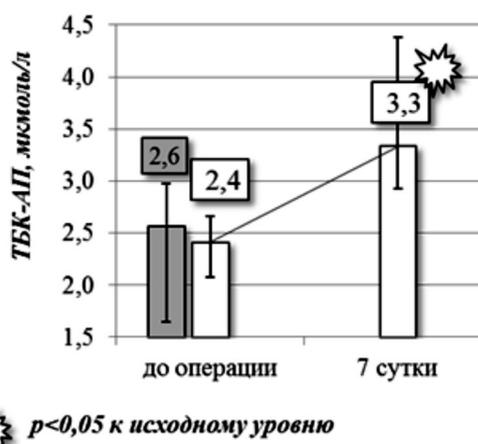


Рис. 2. Концентрация ТБК-активных продуктов в крови у кроликов

системной воспалительной реакции наряду с современными высокотехнологичными показателями [3]. Таким образом, динамика представленных выше лабораторных показателей убедительно подтверждает развитие ожидаемого системного воспалительного ответа у кроликов основной группы в условиях множественной скелетной травмы.

Одним из важных звеньев патогенеза оксидативного стресса, тесно связанного с СВО, является усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ). Рис. 2 иллюстрирует динамику концентрации в крови у лабораторных животных ТБК-активных агентов, конечных продуктов, характеризующих активность перекисного окисления. У кро-

ликов основной группы дооперационный показатель не имел достоверных отличий от данных контрольной группы, а через неделю после операционной травмы значительно увеличивался, подтверждая развитие оксидативного стресса в условиях множественной скелетной травмы.

Очевидно, что при системном воздействии оксидативного стресса выраженность повреждения внутренних органов во многом зависит от состояния собственной антиоксидантной защиты каждого органа. Поэтому мы изучили содержание основных компонентов системы глутатиона в сердце, лёгких, печени и почках лабораторных животных (таблица, рис. 3–5).

Содержание глутатионпероксидазы во внутренних органах кроликов, Me ( $P_{25}$ ;  $P_{75}$ ).

Группы	ГПО, мкмоль/ мин/ г			
	печень	почки	сердце	лёгкие
контроль	622 (382; 1036)	441 (339; 629)	211 (154; 233)	284 (172; 485)
основная	398 (238; 574)	319 (196; 522)	203 (136; 297)	198 (135; 294)
р между группами	0,273	0,473	0,744	0,794

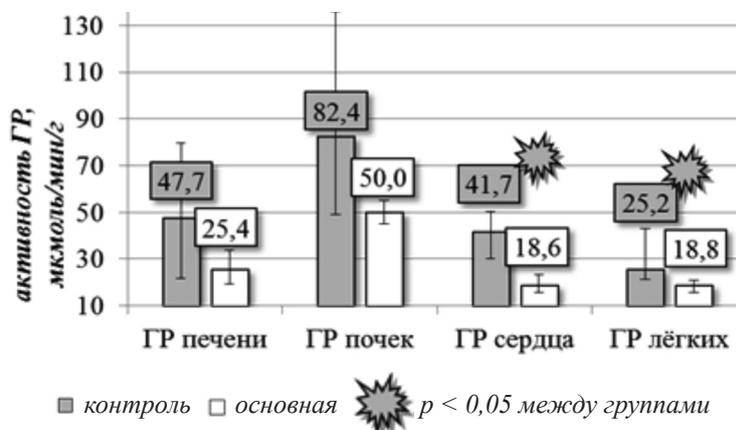


Рис. 3. Активность глутатионредуктазы во внутренних органах лабораторных животных

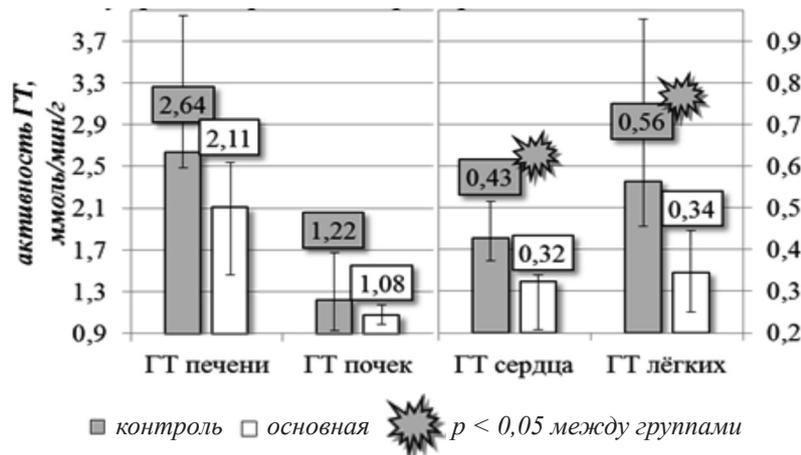


Рис. 4. Активность глутатионтрансферазы во внутренних органах лабораторных животных

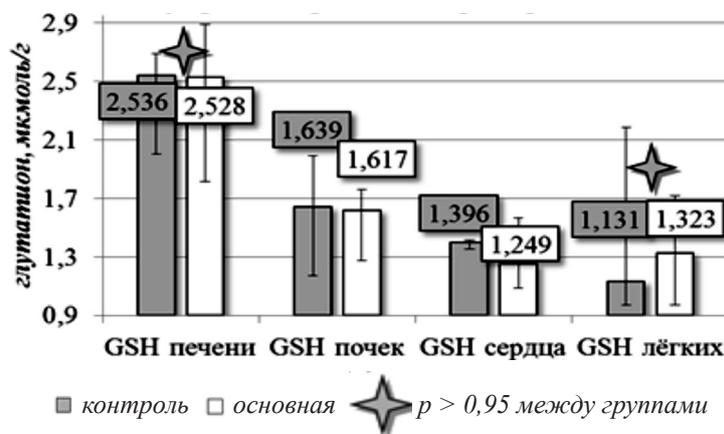


Рис. 5. Содержание восстановленного глутатиона во внутренних органах лабораторных животных

**Сердце.** По сравнению с результатами исследования состояния системы глутатиона в сердце у кроликов контрольной группы, у лабораторных животных основной группы в условиях множественной скелетной травмы было установлено статистически значимое снижение активности двух ферментов – глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ). При этом активность глутатионредуктазы уменьшалась значительно (-55%,  $p < 0,001$ ), в то время, как зарегистрированная активность глутатионтрансферазы в сердце у животных основной группы снижалась менее выражено (-24%,  $p = 0,005$ ). При исследовании активности фермента глутатионпероксидазы (ГПО) и содержания восстановленного глутатиона (GSH) в сердце лабораторных животных статистически значимых межгрупповых отличий выявлено не было.

**Лёгкие.** Изменения компонентов системы глутатиона в лёгких кроликов основной группы через неделю после множественной скелетной травмы в целом аналогичны таковым изменениям, зарегистрированным в сердце лабораторных животных. Сопо-

ставление с референсными показателями контрольной группы выявило в лёгких кроликов основной группы статистически достоверное снижение активности глутатионредуктазы на 26% ( $p = 0,023$ ) и глутатионтрансферазы на 39% ( $p = 0,013$ ). Изменение активности фермента глутатионпероксидазы в лёгких кроликов основной группы не подтверждалось статистическим анализом ( $p = 0,794$ ), а содержание восстановленного глутатиона в лёгких у лабораторных животных сравниваемых групп было одинаковым ( $p = 1$ ).

**Печень и почки.** Несмотря на явную тенденцию к снижению активности всех трёх исследованных нами ферментов системы глутатиона в печени и почках у кроликов основной группы в условиях множественной скелетной травмы, эти изменения относительно данных контрольной группы не были статистически значимыми. Показатели содержания восстановленного глутатиона в почках у лабораторных животных исследованных групп не имели достоверных отличий ( $p = 0,871$ ), а в печени статистически достоверно были равны ( $p = 1$ ).

### Выводы

1. У кроликов породы Шиншилла в условиях множественной скелетной травмы выявлены признаки формирования системного воспалительного ответа и оксидативного стресса.

2. Через неделю после множественной скелетной травмы у кроликов выявлен дисбаланс компонентов системы глутатиона в сердце и лёгких, в то время как изменения в печени и почках были недостоверными. Содержание восстановленного глутатиона в печени и лёгких не изменялось.

3. Функциональная активность системы глутатиона у лабораторных животных в условиях множественной скелетной травмы сохранялась во всех исследованных органах.

### Список литературы

1. Апарцин К.А. МОСТ: мониторинг травматизма при сочетанных механических повреждениях/ Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2005. – № 3. – С. 112–114.
2. Биохимия: учебник для вузов/ Под ред. Северина Е.С. – М.: Гэотар-Мед, 2003. – 779 с.
3. Гельфанд Б.Р. Прокальцитонинный тест в комплексной оценке тяжести состояния больных с деструктивным панкреатитом // Consilium medicum. – 2002. – №2. – С. 36–38.
4. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Общая патофизиология (с основами иммунопатологии). – СПб., 2005. – ЭЛБИ-СПб. – 656 с.
5. Кальф-Калиф Я.Я. О лейкоцитарном индексе интоксикации и его практическом значении // Врачебное дело. – 1941. – № 1. – С. 31–35
6. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред, защита // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 2–7.
7. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона II. Другие ферменты, тиол-дисульфидный обмен, воспаление и иммунитет, функции / Биомедицинская химия, 2009. – № 4. – С. 365–379.
8. Самохвалов И.М. Системный воспалительный ответ – адаптационная реакция организма на травму // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2009. – № 4(28). – С. 91–96.
9. Титов В.Н. Эндогенная система противостояния окислительному стрессу, роль дегидро-эпиандростерона и олеиновой жирной кислоты/ Успехи современной биологии. – Т. 129, № 1. – Январь-февраль 2009. – С. 10–26
10. Anderson M.E. Enzymatic and chemical methods for the determination of glutathione // Glutathione. – 1989. – P. 339–365.
11. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., et al. Definitions for sepsis and organ failure and guide lines for the use of innovative therapies in sepsis: the ACCP/SCCM consensus conference committee // Chest. – 1992. – Vol. 101. – P. 1644–1655.
12. Flohe L. Glutathione peroxidase // Basic Life Sci. – 1989. – N 49. – P. 663–668.
13. Habig W.H., Pabst M.J., Yakoby W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. – 1974. – Vol. 249, № 22. – P. 7130–7139.

14. Mannervik B., Carlberg J., Larson K. Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects Part. A: Coenzymes and cofactors / Eds. Dolphin D., Avramovic O., Poulson R. – N.Y.: John Wiley and Sons, 1989. – Vol. 3. – P. 475–516.

### References

1. Apartsin K.A. MOCT: monitoring of traumatism at concomitant mechanical injuries // Bulletin of ESSC SB RAMS. – 2005. – no. 3. – pp. 112–114.
2. Biochemistry: university textbook / Ed. E.S. Severin. – Moscow: GEOTAR-Med, 2003. – 779 p.
3. Gelfand B.R. Procalcitonin test in complex evaluation of severity of condition of patients with destructive pancreatitis // Consilium medicum. – 2002. – no. 2. – pp. 36–38.
4. Zaichik A.Sh., Churilov L.P. General pathophysiology with the principles of immunopathology. – Saint-Petersburg: ELBI-SPb, 2005. – 656 p.
5. Kalf-Kalif Ya.Ya. About leukocytal intoxication index and its practical significance // Medical practice (Vrachebnoye delo). – 1941. – no. 1. – pp. 31–35.
6. Kulinskiy V.I. Reactive oxygen species and oxidative modification of macromolecules: advantages, disadvantages, protection // Soros Educational Journal. – 1999. – no. 1. – pp. 2–7.
7. Kulinskiy V.I., Kolesnichenko L.S. Glutathione system. II. Other enzymes, thiol-disulphide metabolism, inflammation and immunity, functions // Biomedical chemistry (Biomeditsinskaya Khimiya). – 2009. – no. 4. – pp. 365–379.
8. Samokhvalov I.M. Systemic inflammatory response – adaptive reaction of the organism on trauma // Bulletin of Russian Military-Medical Academy (Vestnik Rossiyskoy Voenno-Meditsinskoy Akademii). – 2009. – no. 4 (28). – pp. 91–96.
9. Titov V.N. Endogenous system of opposition to oxidative stress, role of dehydroepiandrosterone and oleic acid / Biology Bulletin Reviews (Uspekhi Sovremennoy Biologii). – Vol. 129, no. 1. – January-February, 2009. – pp. 10–26.
10. Anderson M.E. Enzymatic and chemical methods for the determination of glutathione // Glutathione. – 1989. – pp. 339–365.
11. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., et al. Definitions for sepsis and organ failure and guide lines for the use of innovative therapies in sepsis: the ACCP/SCCM consensus conference committee // Chest. – 1992. – Vol. 101. – pp. 1644–1655.
12. Flohe L. Glutathione peroxidase // Basic Life Sci. – 1989. – no. 49. – pp. 663–668.
13. Habig W.H., Pabst M.J., Yakoby W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. – 1974. – Vol. 249, no. 22. – pp. 7130–7139.
14. Mannervik B., Carlberg J., Larson K. Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects Part. A: Coenzymes and cofactors / Eds. Dolphin D., Avramovic O., Poulson R. – N.Y.: John Wiley and Sons, 1989. – Vol. 3. – pp. 475–516.

### Рецензенты:

Голуб И.Е., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии, ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет Минздрава России», г. Иркутск;

Шолохов Л.Ф., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории физиологии и патологии эндокринной системы ФГБУ «НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, г. Иркутск.

Работа поступила в редакцию 14.08.2014.