

УДК 616-001.17.1-008.61

ФЕДОРОВА А.А., БОРЗЕНКО Б.Г., ГНИЛОРЫБОВ А.М.

Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака НАМН Украины

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

## ОСОБЕННОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

**Резюме.** NO-доноры успешно применяются при лечении разной патологии для расширения сосудов и кардиопротекции. Но инфузии раствора L-аргинина в больших объемах могут стимулировать окислительный стресс. Мы исследовали суммарную концентрацию нитратов/нитритов в крови, содержание медь-зависимых антиоксидантов и субстрата для связывания NO — восстановленного глутатиона у тяжелообожженных, которые при лечении ожогового шока получали L-аргинин. Нами было выявлено, что на 3-и сутки лечения по окончании ожогового шока у 15 % пострадавших наблюдалось более значительное, чем у остальных, увеличение концентрации NO<sub>x</sub> (в 1,5 раза), отсутствие возрастания активности супероксиддисмутазы, низкий уровень восстановленного глутатиона (в 2 раза ниже контрольного) и достоверное снижение в 1,6 раза по сравнению с другими и в 2,5 раза по сравнению с контролем содержания церулоплазмينا. Значит, можно говорить о значительном угнетении антиоксидантной защиты клеток при одновременном увеличении продукции оксида азота после инфузии L-аргинина у этих пациентов. Летальность в этой группе составила 100 %. Таким образом, наши данные свидетельствуют о необходимости исследования вышеперечисленных показателей при индивидуальной оценке эффективности использования NO-доноров для лечения тяжелообожженных.

**Ключевые слова:** антиоксиданты, ожоги, NO-доноры.

### Введение

В течение нескольких часов после получения термической травмы в организме пострадавшего развивается 1-я стадия ожоговой болезни (ОБ) — ожоговый шок (ОШ). Тяжелая гиповолемия, централизация кровообращения и микроциркуляторные расстройства приводят к выраженным гипоксическим изменениям в тканях [1]. В ответ на гипоксию должно происходить адаптационное усиление продукции оксида азота (NO) уже в 1-е сутки ОШ, поскольку NO обладает антитромбогенным и сосудорасширяющим действием [2]. Поэтому для стимуляции NO-синтаз обожженным назначаются инфузии раствора L-аргинина (тивортин), который является субстратом для NO-синтаз и донором NO [3].

На 3-и сутки периферическое кровообращение восстанавливается и ожоговый шок переходит в стадию острой ожоговой токсемии (ООТ) [4], при которой кислородное снабжение тканей лишь частично нормализуется.

Вследствие гипоксии при ОШ происходит избыточная генерация активных форм кислорода (АФК), в частности супероксидного анион-радикала [4]. O<sub>2</sub><sup>-</sup> взаимодействует с оксидом азота с большой скоростью, в результате образуется пероксинитрит (ПН). При этом NO утрачивает свою физиологическую активность, тогда как ПН обладает радикальными свойствами и инициирует развитие нитрозативного стресса [5]. В норме большая часть супероксидного анион-радикала инактивируется медь-зависимой супероксиддисмутазой (СОД). При неадекватном функ-

ционировании антиоксидантной (АО) системы избыток АФК и ПН приводит к развитию окислительного и нитрозативного стрессов [5]. Известно, что значительные объемы инфузии L-аргинина могут углублять окислительный стресс [6].

SH-группы восстановленного глутатиона (GSH) связывают как оксид азота, так и ПН, в результате чего образуются S-нитрозоглутатионы, которые рассматриваются современными исследователями как легкодоступные депо NO [5, 7]. Кроме того, S-нитрозоглутатионы являются посредниками в реакциях транснаитрозилирования белков и ферментов и таким образом регулируют в норме их активность [5, 7].

Регенерация оксида азота из S-нитрозотиолов происходит при участии ионов меди [7]. Ионы меди присутствуют во внутренних средах организма только в связанном виде, в первую очередь в составе антиоксидантного фермента церулоплазмينا (ЦП). Ранее было обнаружено, что снижение или возрастание концентрации ЦП в плазме крови оказывает прямо пропорциональное действие на уровень нитритов в крови в норме [8]. Также он осуществляет доставку ионов меди к медь-зависимым ферментам.

**Целью** нашей работы было оценить активность антиоксидантной защиты у пострадавших с

© Федорова А.А., Борзенко Б.Г., Гнилорыбов А.М., 2014

© «Травма», 2014

© Заславский А.Ю., 2014

ожогами, которые получали NO-донор — раствор L-аргинина.

## Материалы и методы

Было обследовано 60 обожженных в возрасте от 18 до 56 лет в 1-е сутки после травмы до начала лечения и на 3-и сутки лечения при выходе из шока на стадии острой ожоговой токсемии. Все они поступили в Донецкий ожоговый центр в 2008–2012 гг. в результате шахтных травм при взрыве метано-угольной смеси. Пострадавшие с комбинированными травмами в данное исследование не вошли.

Модифицированный индекс тяжести поражения [4] у всех больных превышал 90 ед., то есть это были пациенты с крайне тяжелыми ожогами. Все обожженные получали инфузионную противошоковую терапию, в том числе и раствор L-аргинина (тивортин) в объеме, соответствующем степени тяжести ОШ. При анализе результатов биохимического обследования пострадавших была выявлена группа больных с наиболее выраженными метаболическими нарушениями. На основании этих данных обследованные были разделены на две группы: 1-я — 51 пациент, 2-я — 9 пациентов с крайне выраженными дисметаболическими изменениями. Также было обследовано 17 условно здоровых доноров (группа контроля).

Для получения гемолизата эритроцитов набирали 4 мл крови из вены с добавлением 60 мкл 7,5% ЭДТА, после чего центрифугировали ее 10 минут при 3000 об/мин. Плазму отбирали для определения в ней церулоплазмينا, из оставшейся клеточной суспензии отбирали 0,4 мл для последующей 3-кратной отмывки физраствором, после чего разводили отмывые эритроциты в 4 раза дистиллированной водой и замораживали.

Для определения концентрации GSH в эритроцитах к 0,6 мл разведенного в 4 раза дистиллированной водой гемолизата добавляли 0,2 мл 20% сульфосалициловой кислоты, центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин. Смешивали 0,2 мл супернатанта с 2,55 мл 0,1-М трис • HCl буфера pH 8,5, содержащего 0,01% ЭДТА, и 0,025 мл 4% раствора 5,5'-дितिобис-2-нитробензойной кислоты в метаноле, измеряли поглощение при  $\lambda = 412$  нм на КФК-3-01 (Россия), затем рассчитывали концентрацию GSH по калибровочному графику [9].

Для определения активности СОД в стеклянной пробирке 0,1 мл отмывых эритроцитов растворяли в 0,9 мл 5-мМ трис • HCl pH 7,4 для получения гемолизата, добавляли 0,25 мл этанола и 0,15 мл хлороформа, затем замораживали. После размораживания центрифугат разводили в 2,5 раза 5-мМ К-фосфатным буфером с 0,0001-М ЭДТА pH 7,8.

Через 30 с после добавления 0,2 мл  $2,25 \cdot 10^{-3}$  М раствора адреналина в инкубационную смесь (0,25 мл К-фосфатного буфера + 0,25 мл разведенного центрифугата + 0,35 мл 0,15-М Na-карбонатного буфера pH 10,2 с ЭДТА  $3 \cdot 10^{-4}$  М) в кювете 1 см на спектрофотометре измеряли кинетику окисления адреналина при  $\lambda = 480$  нм через каждые 30 с в течение 2,5 минуты против холостой пробы (в инкубационной смеси вместо центрифугата и раствора адреналина — дистиллированная вода), после чего рассчитывается  $\Delta E_0$  за минуту.

С учетом разведения активность СОД  $A = 13 \cdot T$ , где  $T$  — торможение,  $T = \Delta E / \Delta E_a$ ;  $\Delta E = \Delta E_a - \Delta E_0$ , где  $\Delta E_a$  — изменение экстинкции автоокисления адреналина (в инкубационной смеси вместо центрифугата — дистиллированная вода) за 1 мин [10].

Суммарную концентрацию нитратов/нитритов ( $NO_x$ ) определяли спектрофотометрически по реакции с реактивом Грисса. 0,25 мл сыворотки крови разводили дистиллированной водой в 6 раз, добавляли 0,5 мл 15% уксусной кислоты, после чего встряхивали пробу в течение 1 мин с 30 мг смеси порошка металлического цинка с  $MnSO_4$  в соотношении 1 : 100 для восстановления нитратов в нитриты, потом добавляли 0,25 мл реактива Грисса и измеряли поглощение при  $\lambda = 538$  нм на спектрофотометре Genesys 10UV. Расчет производился по калибровочному графику, построенному на основании раствора 10-мкМ  $NaNO_3$  [11].

В основе метода определения содержания ЦП лежит инкубация в течение 1 часа при 37 °С 0,05 мл плазмы крови с 4 мл 0,4-М ацетатного буфера pH 5,5 и 0,5 мл 1% водного раствора п-фенилендиамина. Под действием церулоплазмينا в пробе образуются окрашенные продукты. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 1% NaF, после чего охлаждали в холодильнике 30 минут. Измеряли поглощение при  $\lambda = 540$  нм на КФК-3-01 против холостой пробы, которая содержала 0,05 мл дистиллированной воды вместо плазмы, и 1% NaF туда добавлялся перед началом инкубации. Для расчета содержания ЦП значение экстинкции умножали на фактор 875 [12].

Для статистической обработки результатов использовали программу Statistica. Результаты выражали в виде: среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверность отличий между группами оценивали по t-критерию Стьюдента, достоверными считались отличия при условии  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В 1-е сутки после получения травмы уровень  $NO_x$  достоверно возрастал почти в два раза по сравнению с контролем только во 2-й группе (табл. 1). Следовательно, наши данные свидетельствовали о недостаточной активации NO-синтаз у больных 1-й группы сразу после получения ожога. Это подтверждает данные литературы [2, 13] о противоположном действии гипоксии на экспрессию гена эндотелиальной NO-синтазы в зависимости от продолжительности кислородной недостаточности и типа эндотелиоцитов. В случае с пострадавшими от ожогов уместнее говорить о зависимости повышения уровня  $NO_x$  от тяжести и глубины травмы. При глубоких ожогах происходит поражение не только клеток кожи, но и клеток сосудов, в том числе и легочных. Таким образом, наши результаты подтверждают целесообразность назначения инфузий L-аргинина пациентам 1-й группы. Во 2-й группе необходимость использования доноров NO при исходно повышенной концентрации нитратов/нитритов не кажется такой очевидной.

Важную диагностическую информацию можно получить при исследовании показателей АО-системы, которые тесно взаимосвязаны с метаболизмом оксида азота.

Так, в нормі СОД являється основним фактором, предупреждающим образование цитотоксического ПН. Необходимо отметить, что в 1-е сутки после травмы достоверное возрастание активности СОД наблюдалось только в 1-й группе. Во 2-й группе важный фермент защиты против АФК проявлял активность на уровне контрольной группы.

Церулоплазмин транспортирует медь ко всем ферментам, содержащим этот металл в активном центре, в том числе и к СОД. Однако у обследованных нами пострадавших содержание ЦП было снижено в 2 раза в 1-й группе и в 2,5 раза — во 2-й. Такое резкое снижение уровня основного переносчика меди может отрицательно сказываться на функционировании СОД как медь-зависимого энзима. Соответственно, в данных условиях вероятность образования ПН при взаимодействии  $O_2^-$  и NO увеличивается.

В клетках присутствует природная ловушка для ПН — восстановленный глутатион. Изменение концентрации восстановленного глутатиона в эритроцитах также достоверно различалось. У пациентов 1-й группы наблюдалось снижение его содержания только в 1,6 раза, тогда как во 2-й группе уровень GSH снижался в 2 раза. То есть у обожженных этой группы уже в 1-е сутки после травмы регистрировалось истощение субстратов для связывания NO и пероксинитрита на фоне значительно возросшей концентрации  $NO_x$ .

Итак, уже на стадии ОШ у больных с крайне тяжелыми ожогами прослеживалось две тенденции. У большей части пострадавших (1-я группа) не происходило достоверное возрастание  $NO_x$ , зато увеличивалась активность СОД, при этом содержание GSH умеренно снижалось и резко снижался уровень церулоплазмينا в плазме. То есть АО-система эффективно функционировала уже на 1-й линии защиты против свободных радикалов. У 15 % обожженных (2-я группа) была совсем иная картина: суммарная кон-

центрация  $NO_x$  резко возрастала на фоне явного истощения АО-ресурсов клеток.

На 3-и сутки лечения NO-донорами по окончании шока на стадии ООТ различия в активности АО-системы у пострадавших сохранялись (табл. 2).

Об активации NO-синтаз после инфузионной терапии с использованием L-аргинина свидетельствовала достоверно возросшая концентрация  $NO_x$  у всех обожженных. Однако пул GSH достоверно ( $p < 0,05$ ) снижался в 1,5 раза по сравнению с исходным уровнем на стадии ОШ у больных 1-й группы и оставался очень низким во 2-й группе. Таким образом, наблюдался очевидный дисбаланс в концентрации субстратов для синтеза физиологически активных депо оксида азота — S-нитрозоглутатионов на этой стадии у всех пострадавших.

Наиболее выраженные изменения сохранялись в медь-зависимом звене АО-защиты. Так, у пациентов 1-й группы активность СОД оставалась на том же повышенном уровне, при этом содержание церулоплазмينا достоверно ( $p < 0,05$ ) увеличивалось в 1,2 раза по сравнению со значениями этого показателя на стадии ОШ в этой группе.

У больных 2-й группы, наоборот, углублялись тенденции к снижению эффективности АО-защиты. СОД не возрастала, а уровень церулоплазмينا был снижен уже в 2,5 раза. Возможно, такое низкое содержание переносчика меди у этих пациентов и обуславливало неэффективность 1-й линии инактивации АФК.

По тяжести травмы больные 1-й и 2-й групп принципиально не отличались, лечение им назначалось по одному и тому же принципу, в том числе все они получали NO-донор L-аргинин. Но следует отметить, что на 3-и сутки лечения при выходе из ОШ 1-я группа больных характеризовалась положительной динамикой изменений АО-системы, тогда как у пациентов 2-й группы регистрировались самая высокая концентрация  $NO_x$ , низкое содержание GSH, очень

**Таблица 1. Суммарная концентрация  $NO_x$  и показатели антиоксидантной защиты у больных в ожоговом шоке ( $M \pm m$ )**

Группа больных	Концентрация $NO_x$ в сыворотке крови, мкмоль/л	Концентрация GSH, мкмоль/л	Активность СОД в эритроцитах, усл.ед./л	Содержание церулоплазмينا в плазме, мг/л
Контроль (n = 17)	8,60 ± 0,50	1338 ± 115	11,63 ± 0,20	310 ± 8
1-я (n = 51)	10,20 ± 0,72	837 ± 56**	12,00 ± 0,07*	166 ± 8**
2-я (n = 9)	15,30 ± 1,50**	663 ± 72**	11,80 ± 0,40	146 ± 8**

**Примечания:** \* —  $p < 0,05$  в сравнении с контролем; \*\* —  $p < 0,001$  в сравнении с контролем.

**Таблица 2. Суммарная концентрация  $NO_x$  и показатели антиоксидантной защиты у больных на стадии острой ожоговой токсемии ( $M \pm m$ )**

Группа больных	Концентрация $NO_x$ в сыворотке крови, мкмоль/л	Содержание GSH в эритроцитах, мкмоль/л	Активность СОД в эритроцитах, усл.ед./л	Уровень церулоплазмينا в плазме, мг/л
Контроль (n = 17)	8,58 ± 0,48	1338 ± 115	11,63 ± 0,20	310 ± 8
1-я (n = 51)	11,14 ± 0,83*	555 ± 50*	12,13 ± 0,10*	192 ± 9**
2-я (n = 9)	13,12 ± 2,92*	684 ± 122*	12,00 ± 0,60	122 ± 23***

**Примечания:** \* —  $p < 0,05$  в сравнении с контролем; \*\* —  $p < 0,001$  в сравнении с контролем; # —  $p < 0,05$  в сравнении с 1-й группой.

низкий уровень церулоплазмينا и отсутствие возрастания активности СОД, то есть наблюдались все условия для углубления окислительного и нитрозативного стрессов. Ретроспективный анализ историй болезни выявил, что в 1-й группе все выжили, а во 2-й летальность составила 100 %.

По нашему мнению, такой явно выраженный антиоксидантный дисбаланс у пострадавших 2-й группы мог нивелировать положительный эффект назначения NO-доноров у этих пациентов. Следовательно, вышеперечисленные биохимические показатели могут быть информативны при индивидуализации контроля эффективности лечения препаратами L-аргинина тяжелообожженных.

## Список литературы

1. Мопальцев В.И. Ожоговый шок: патофизиология, клиника, лечение / В.И. Мопальцев, Т.Г. Григорьева // *Лікування та діагностика*. — 2004. — № 2. — С. 33-39.
2. Ожоговый шок / В.П. Шано, В.К. Гринь, Э.Я. Фисталь и др. — Донецк: Юго-восток, 2006. — 176 с.
3. Horton J.W. Arginine in burn injury improves cardiac performance and prevents bacterial translocation / J.W. Horton, J. White, D. Maas et al. // *J. Appl Physiol*. — 1998. — Vol. 84, № 2. — P. 695-702.
4. Комбустиология: учебник / Э.Я. Фисталь, Г.П. Козинец, Г.Е. Самойленко и др. — Донецк, 2005. — 272 с.
5. Pacher P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liandet // *Physiol. Rev.* — 2007. — Vol. 87, № 1. — P. 315-424.
6. Ho-Shiang H. Chronic L-arginine administration increases oxidative and nitrosative stress in rat hyperoxaluric kidneys and

*excessive crystal deposition* / H. Ho-Shiang, M. Ming-Chieh, J. Chen // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* — 2008. — Vol. 295, august. — P. 388-396.

7. Каминская Л.Ю. Влияние донатора NO нитрозотиола глутатиона на уровень окислов азота и малонового диальдегида в крови крыс / Л.Ю. Каминская, А.А. Жлоба, О.М. Мусеев и др. // *Артер. гипертензия*. — 2005. — Т. 11, № 1.
8. Samuel T.K. Copper and nitric meet in the plasma / T.K. Samuel, J.D. Giltin // *Nature Chemical Biology*. — 2006. — № 2. — P. 452-453.
9. *Медицинские лабораторные технологии: Справочник / Под ред. А.И. Карпищенко*. — СПб.: Интермедика, 2002. — 600 с.
10. Доронина О.А. Определение активности Cu/Zn-супероксиддисмутазы и пренатальная диагностика синдрома Дауна / О.А. Доронина, В.А. Бурлев, В.А. Бахарев // *Пробл. репродукции*. — 1996. — № 4. — С. 71-74.
11. Киселик І.А. Особливості визначення нітратів та нітритів у крові хворих на вірусні гепатити та жовтяниці іншої етіології / І.А. Киселик, М.Д. Луцик, Л.Ю. Шевченко // *Лабораторна діагностика*. — 2001. — № 3. — С. 43-45.
12. Горячковский А.М. Клиническая биохимия / А.М. Горячковский. — Одесса: Астропринт, 1998. — 608 с.
13. Hypoxia-induced endothelial NO synthase gene transcriptional activation is mediated through the tax-responsive element in endothelial cells / Jiho Min, Yoon-Mi Jin, Je-Sung Moon et al. // *Hypertension*. — 2006. — V. 47. — P. 1189-1196.

Получено 12.05.14 ■

Федорова Г.О., Борзенко Б.Г., Гнилорибов А.М.  
 Інститут невідкладної та відновної хірургії ім. В.К. Гусака  
 НАМН України  
 Донецький національний медичний університет  
 ім. М. Горького

## ОСОБЛИВОСТІ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ПРИ ТЕРМІЧНІЙ ТРАВМІ

**Резюме.** NO-донори успішно застосовуються при лікуванні різної патології для розширення судин та кардіопротекції. Але інфузії розчину L-аргініну у великих об'ємах можуть стимулювати окислювальний стрес. Ми досліджували сумарну концентрацію нітратів/нітритів у крові, уміст мідь-залежних антиоксидантів та субстрату для зв'язування NO — відновленого глутатіону у тяжкообпечених, які при лікуванні опікового шоку отримували L-аргінін. Нами було виявлено, що на 3-тю добу лікування після закінчення опікового шоку у 15 % постраждалих спостерігалось значніше, ніж у решти, збільшення концентрації NO<sub>x</sub> (в 1,5 раза), відсутність зростання активності супероксиддисмутазы, низький рівень відновленого глутатіону (у 2 рази нижче за контроль) і вірогідне зниження в 1,6 раза порівняно з іншими та у 2,5 раза порівняно з контролем умісту церулоплазмину. Отже, можна говорити про значне пригнічення антиоксидантного захисту клітин при одночасному збільшенні продукції оксиду азоту після інфузії L-аргініну у цих пацієнтів. Летальність в цій групі становила 100 %. Таким чином, наші дані свідчать про необхідність дослідження вищеперелічених показників при індивідуальній оцінці ефективності використання NO-донорів для лікування тяжкообпечених.

**Ключові слова:** антиоксиданти, опіки, NO-донори.

Fedorova A.A., Borzenko B.G., Gnilyoribov A.M.  
 Institute of Urgent and Reconstructive Surgery named after V.K. Gusak of National Academy of Medical Sciences of Ukraine  
 Donetsk National Medical University named after M. Gorky,  
 Donetsk, Ukraine

## FEATURES OF ANTIOXIDANT PROTECTION IN THERMAL INJURY

**Summary.** NO-donors are being successfully used for treatment of various pathologies as vasodilators and cardioprotective drugs. But infusion of great volumes of L-arginine solution can stimulate oxidative stress. We have studied total concentration of nitrates/nitrites in the blood, content of copper-dependent antioxidants and NO-binding — reduced glutathione substrate in patients with severe burns, who received L-arginine during the treatment for burn shock. We have detected that on the 3<sup>rd</sup> day of treatment after the end of burn shock, 15 % of victims reported more significant, than in other patients, NO<sub>x</sub> concentration (by 1.5 times), no increase in superoxide dismutase activity, low level of reduced glutathione (2-fold lower than the control one) and a significant decrease, by 1.6 times in comparison with other patients, and 2.5-fold compared with the controls, of ceruloplasmin content. Hence, we can talk about a significant inhibition of cell antioxidant protection while increasing nitric oxide production after infusion of L-arginine in these patients. Mortality in this group was 100 %. Thus, our data suggest the need to study the above-mentioned indicators with individual assessment of the effectiveness of using NO-donors for the treatment of patients with severe burns.

**Key words:** antioxidants, burns, NO-donors.