УДК 577:616.7
©Коллектив авторов

# ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

***Е.И Львовская*, Н.В. Держинский, В.А. Садова, Д.Б. Сумная***

Уральский государственный университет физической культуры,
454091, Челябинск, ул. Орджоникидзе 1, эл. почта: lvovskaya@mail.ru

В крови и ликворе пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой при благоприятных и летальных исходах проанализирована динамика содержания липопероксидов, соотношение свободно-радикального окисления липидов и белков, интенсивность $Fe^{2+}$-аскорбат-индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы (ГП), супероксиддисмутазы (СОД), каталазы) и прооксидантного фермента – ксантиноксидазы. Выявлены реципрокные отношения между липопероксидацией и окислительной модификацией белков с первых по 14 сутки, увеличение уровня суммарной антиокислительной активности, сопровождающееся ростом активности ГП, каталазы на фоне снижения активности СОД с 1 по 7 сутки. У пациентов с последующим развитием летальных исходов установлено более низкое “среднее” содержание липопероксидов в крови и ликворе (по сравнению с благоприятными исходами), снижение гептанофильных липопероксидов в сыворотке крови ниже контрольного уровня, снижение уровня антиокислительной активности в крови и ликворе, ассоциированное с резким падением активности супероксиддисмутазы и выраженным приростом активности ксантиноксидазы.

**Ключевые слова:** свободнорадикальное окисление липидов и белков, про- и антиоксидантные ферменты

**DOI:** 10.18097/PBMC20166201107

## ВВЕДЕНИЕ

Медико-социальная значимость тяжёлой черепно-мозговой травмы связана с высокой частотой её возникновения, а в последующем – длительной нетрудоспособностью, частой инвалидизацией, высокой смертностью, особенно среди лиц молодого и среднего возраста. Среди пострадавших от черепно-мозговой травмы (ЧМТ) 92% составляют люди трудоспособного возраста. Тяжёлая ЧМТ требует длительного лечения и больших финансовых затрат.

Головной мозг восприимчив к окислительному стрессу в связи с высоким потреблением кислорода мозговой тканью. Потенцированию окислительного стресса в тканях головного мозга способствует большое количество катехоламинов, фосфолипидов, олеиновой кислоты, $Fe^{2+}$, высокое отношение липиды/белки и т.д. [1, 2].

Целью настоящей работы было исследование в крови и ликворе пациентов с тяжёлой ЧМТ динамики параметров, характеризующих свободно-радикальное окисление липидов и белков.

## МЕТОДИКА

В условиях городского нейрохирургического центра обследованы больные мужского пола в возрасте 20-59 лет в остром периоде травмы (на 1-3, 4-7, 8-14 и на 15-30 сутки) различной локализации и степени тяжести: 454 пациента с благоприятным течением и 98 пациентов с развитием внутри- (менингиты, энцефалиты, абсцессы) и внечерепных осложнений (пневмоний). Из исследования были исключены пациенты с явной сопутствующей патологией, а также с повторной ЧМТ травмой в анамнезе. У всех пациентов травматическое повреждение головного мозга было подтверждено компьютерной томографией. Группу контроля составили 157 мужчин в возрасте 20-59 лет. От всех обследуемых было получено информированное согласие на участие в исследовании и использовании их биопроб.

Продукты ПОЛ определяли в гептан-изопропанольных экстрактах биологического материала спектрофотометрически [3]. Результаты рассчитывали в виде индексов окисления – $E_{232}/E_{220}$ и $E_{278}/E_{220}$, отражающих относительный уровень первичных (диеновые коньюгаты – ДК) и вторичных (кетодиены – КД и сопряжённые триены – СТ) продуктов ПОЛ соответственно. Определение конечных продуктов ПОЛ (Шиффовы основания – ШО) проводили спектрофотометрически [4]. Определение интенсивности $Fe^{2+}$-аскорбат-индуцированного ПОЛ проводили в модификации Львовской [5]. Окисляемость липидных экстрактов оценивали по соотношению величин оптических плотностей $E_{232}/E_{220}$ и $E_{278}/E_{220}$, определяемых до и после внесения инициирующей ПОЛ смеси, или выражали в процентах по отношению к исходному уровню. В работе использовали следующие обозначения: АОА-1 – соотношение величин оптических плотностей $E_{232}/E_{220}$, определяемых до и после внесения инициирующей ПОЛ смеси и выраженное в процентах по отношению к исходному, базальному уровню (до индукции, который принимается за 100%, после индукции – х%); АОА-2 – соотношение величин оптических плотностей $E_{278}/E_{220}$, определяемых до и после внесения инициирующей ПОЛ смеси, и выраженное в процентах по отношению к исходному уровню.

* - адресат для переписки

Окислительную модификацию белков оценивали по уровню образования динитрофенилгидразонов [6]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по методу Чевари и соавт. [7]. Активность ксантиноксидазы в сыворотке крови определяли спектрофотометрически при длине волны 292 нм, регистрируя образование мочевой кислоты из ксантина [8]. Активность каталазы в сыворотке крови определяли по методу Королюк и соавт. [9]. Активность глутатионпероксидазы в эритроцитах определяли, используя метод, описанный Власовой и соавт. [10].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активация процессов ПОЛ была общей реакцией мозга на повреждение (рис. 1,2, табл. 1). В динамике острого периода ЧМТ содержание липопероксидов (ЛП) повышалось уже в 1 сутки после ЧМТ и не возвращалось к норме даже к 30 суткам. Для левополушарной локализации (лёгкой, средней и тяжёлой степени тяжести) было характерно более значительное повышение уровня всех категорий продуктов ПОЛ, чем при правополушарной; при этом левополушарная локализация ЧМТ сопровождалась большим количеством внутричерепных воспалительных (менингиты, энцефалиты, абсцессы) и внечерепных воспалительных осложнений – пневмоний.

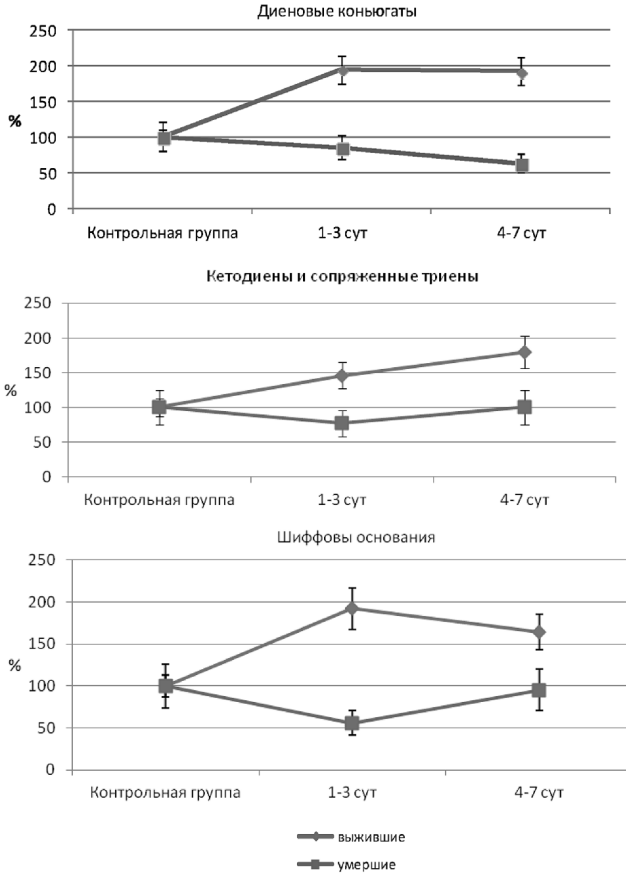


**Рисунок 1.** Сравнительное содержание гептанофильных липопероксидов сыворотки крови в острый период тяжелой черепно-мозговой травмой у пациентов с летальным и благоприятным исходом.

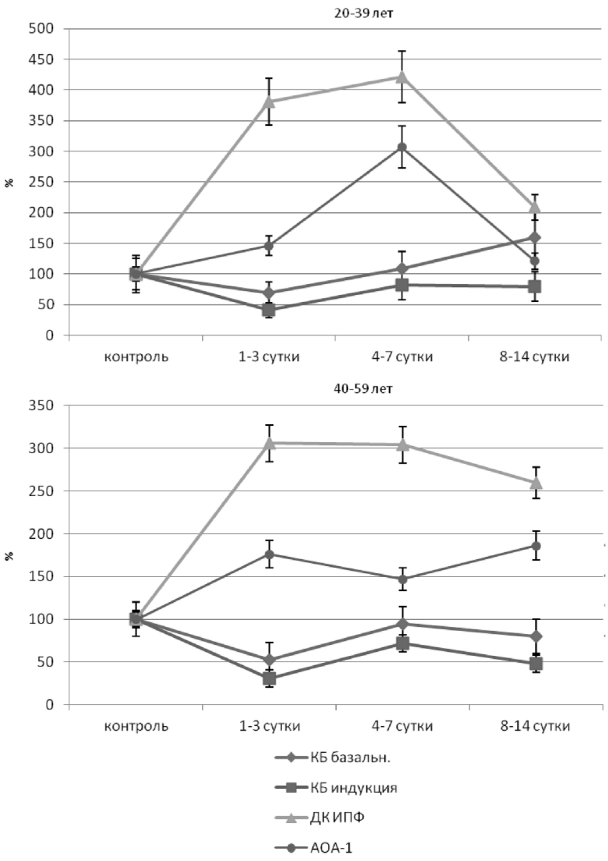


**Рисунок 2.** Сравнительная динамика изменений ОМБ, ИРДК и АОА-1 в сыворотке крови у пациентов разных возрастных групп с тяжелой ЧМТ.

У пациентов с тяжелой ЧМТ травмой содержание всех категорий липопероксидов в сыворотке крови и ликворе превышали значения контрольной группы уже с 1-3 суток (рис. 2, табл. 1). Изменения содержания растворимых в изопропаноле диеновых коньюгатов (ИДК) сыворотки крови и ликвора у пациентов обеих возрастных групп (20-39 и 40-49 лет), во многом сходны: содержание ИДК ликвора было выше соответствующих показателей в сыворотке крови в контрольной группе, максимальные значения определялись у пациентов возрастной группы 20-39 лет.

В ликворе наибольшие значения ДК были зафиксированы у пациентов 20-39 лет в гептановой фазе на 4-7 сутки, превышавшие значения контрольной группы почти в 7 раз. Наиболее выраженное увеличение концентрации растворимых в изопропаноле кетодиенов (КД) и сопряженных триенов (СТ) сыворотки крови выявлено на 4-7 сутки у пациентов 20-39 лет (421% по сравнению с контролем (табл. 1). Ранее наибольший прирост (до 703%) КД и СТ) в ликворе был определён на 4-7 сутки в гептановой фазе у пациентов 20-39 лет. Наибольшее количество конечных продуктов (662%) в гептановой фазе зафиксировано в ликворе на 1-3 сутки у пациентов 40-59 лет [11]. Таким образом, наиболее выраженное увеличение всех категорий продуктов ПОЛ наблюдалось в ликворе, что, вероятнее всего, обусловлено тем, что данная биологическая среда наиболее приближена к месту “катастрофы” (табл. 1).

*Таблица 1.* Содержание продуктов ПОЛ изопропанольной фазы ликвора у больных различных возрастных категорий в острый период тяжёлой черепно-мозговой травмы.

| Группы | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|
| Возраст | 20-39 лет | | | |
| Показатель | Контроль (n=9) | 1-3 сутки (n=22) | 4-7 сутки (n=22) | 8-14 сутки (n=20) |
| Диеновые конъюгаты | 0,356±0,038 | 1,474±0,108<br>$P_{1-2}<0,05U$ | 1,482±0,106<br>$P_{1-3}<0,05U$ | 1,168±0,010<br>$P_{1-4}<0,05U$<br>$P_{3-4}<0,05U$ |
| Кетодиены и сопряжённые триены | 0,30±0,026 | 1,290±0,108<br>$P_{1-2}<0,05U$ | 1,473±0,113<br>$P_{1-3}<0,05U$ | 0,974±0,008<br>$P_{1-4}<0,05U$<br>$P_{3-4}<0,05U$ |
| Шиффовы основания | 0,022±0,003 | 0,085±0,012<br>$P_{1-2}<0,05U$ | 0,112±0,024<br>$P_{1-3}<0,05U$ | 0,089±0,011<br>$P_{1-4}<0,05U$ |
| Возраст | 40-59 лет | | | |
| Показатель | Контроль (n=9) | 1-3 сутки (n=18) | 4-7 сутки (n=16) | 8-14 сутки (n=18) |
| Диеновые конъюгаты | 0,377±0,043 | 1,240±0,066<br>$P_{1-2}<0,05U$ | 1,324±0,050<br>$P_{1-3}<0,05U$ | 1,013±0,044<br>$P_{1-4}<0,05U$<br>$P_{3-4}<0,05U$ |
| Кетодиены и сопряжённые триены | 0,346±0,029 | 1,146±0,077<br>$P_{1-2}<0,05U$ | 1,147±0,034<br>$P_{1-3}<0,05U$<br>$P_{2-3}<0,05WW$ | 0,922±0,029<br>$P_{1-4}<0,05U$<br>$P_{3-4}<0,05U$ |
| Шиффовы основания | 0,026±0,003 | 0,093±0,004<br>$P_{1-2}<0,05U$ | 0,083±0,008<br>$P_{1-3}<0,05U$ | 0,076±0,015<br>$P_{1-4}<0,05U$ |

Примечание: Диеновые коньюгаты - первичные продукты ПОЛ (Е 232/220). Кетодиены и сопряжённые триены - вторичные продукты ПОЛ ($E_{278}/_{220}$). Шиффовы основания - конечные продукты ПОЛ ($E_{400}/_{232}$). U - тест Манна-Уитни; WW - тест Вальда-Вольфовица. Различия во всех группах достоверны ($p<0,05$), кроме: ДК $P_{2-3}$; КДиСТ $P_{2-3}$; ШО $P_{2-3}$; $P_{3-4}$ у пациентов 20-39 лет и ДК $P_{2-3}$; ШО $P_{2-3}$ ;$P_{3-4}$ у пациентов 40-59 лет.

При анализе динамики содержания растворимых в изопропаноле продуктов ПОЛ в сыворотке крови и ликворе у пациентов с летальным исходом выявлена сходная тенденция с выжившими пациентами (то есть повышение содержания продуктов ПОЛ).

В динамике изменения содержания растворимых в гептане продуктов ПОЛ более отчетливо видны различия между пациентами с благоприятными и летальными исходами (рис. 1). У пациентов с летальными исходами содержание гептанофильных липопероксидов в сыворотке крови было ниже контрольных значений. В ликворе концентрация всех гептанрастворимых продуктов перекисного окисления липидов у пациентов с летальным исходом превышала значения контроля, но была ниже, чем у пациентов с благоприятным исходом.

В целом содержание всех категорий липопероксидов у пациентов с летальным исходом во все сроки исследования и во всех исследуемых средах было ниже, чем у пациентов с благоприятным исходом (за исключением конечных изопропанолрастворимых продуктов).

Свободные радикалы повреждают не только липиды, но и белковые молекулы [12-15]. В остром периоде ЧМТ, на 1-3 сутки от момента получения травмы, происходит снижение содержания базального уровня карбонилированных белков (КБ), а также снижение индуцированных КБ. Эта ситуация сохраняется в течение 14 дней от момента получения травмы (табл. 2).

Между процессами ПОЛ и карбонилирования белков были отмечены реципрокные отношения (рис. 2). Это особенно заметно в первые сутки получения травмы: в данном временном интервале расхождение между карбонилированием белков и липопероксидацией максимально. К 14 суткам наблюдается постепенная и синхронная тенденция к нормализации показателей ПОЛ и окислительной модификации белков [16].

Исследование уровня индуцированного ПОЛ, позволяющего косвенно судить о суммарной антиокислительной активности (АОА), показало, что острый период тяжёлой ЧМТ сопровождается повышением АОА. Наиболее выраженное увеличение уровня индуцированного ПОЛ (как АОА-1, так и АОА-2) у пациентов с благоприятным исходом в сыворотке крови выявлено в возрастной группе 20-39 лет, а в ликворе – у пациентов 40-59 лет. На протяжении всего исследования уровень АОА у всех пациентов с благоприятным исходом превышал значения контрольной группы, в то время как у 3-х из 32-х пациентов с летальным исходом антиокислительная активность снижалась до нулевых значений. У остальных пациентов с летальным исходом был отмечен высокий уровень индуцированного ПОЛ при поступлении с последующим снижением перед летальным исходом. Выявленное раннее у пациентов с летальным исходом снижение содержания липопероксидов и уменьшение уровня антиокислительной активности является неблагоприятным прогностическим критерием.

*Таблица 2.* Окислительная модификация белков плазмы крови пациентов с ЧМТ.

| Показатель | Контроль | 1-3 сутки | 4-7 сутки | 8-14 сутки |
|---|---|---|---|---|
| 20-39 лет | n=18 | n=20 | n=18 | n=18 |
| КБ сп<br>мкМ/мг белка | 0,518±0,035<br>100% | 0,359±0,055<br>69% * | 0,565±0,034<br>109% ** | 0,832±0,24<br>160% |
| КБ инд<br>мкМ/мг белка | 3,385±0,122<br>100% | 1,417±0,211<br>41% * | 2,799±0,147<br>83% * ** | 2,727±0,25<br>81% * |
| 40-59 лет | n=18 | n=21 | n=20 | n=18 |
| КБ сп<br>мкМ/мг белка | 0,547±0,037<br>100% | 0,290±0,032<br>53% * | 0,521±0,09<br>95% | 0,439±0,02<br>80% |
| КБ инд<br>мкМ/мг белка | 2,869±0,194<br>100% | 0,91±0,118<br>32% * | 2,071±0,32<br>72% * ** | 1,381±0,403<br>48% * |

Примечание. Данные представлены в виде средней и её стандартной ошибки. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни и Вальда-Вольфовица для независимых групп. * - статистически значимые отличия от значений контрольной группы ($p<0,05$). ** - статистически значимые различия по периодам ЧМТ.

*Таблица 3.* Динамика изменения активности антиоксидантных ферментов у пациентов с благоприятными и летальными исходами тяжёлой ЧМТ.

| Показатель | Контроль (n=12) P1 | 1-3 сутки (n=28) P2 | 8-14 сутки (n=26) P3 | P | С летальным исходом на 1-3 сутки (n=15) P4 |
|---|---|---|---|---|---|
| Глутатионпероксидаза<br>*мкмоль/мл/мин* | 51,49±1,2 | 58,03±5,3 | 90,38±10,1 | $P_{1-2}$ >0,05<br>$P_{1-3}$ <0,05<br>$P_{2-3}$ <0,05<br>$P_{1-4}$ <0,05 | 74,03±5,9 |
| Каталаза<br>*ммоль / мл / мин (коэф. 4,83)* | 9,27±0,10 | 41,05±5,65 | 37,38±7,00 | $P_{1-2}$ <0,05<br>$P_{1-3}$ <0,05<br>$P_{2-3}$ >0,05<br>$P_{1-4}$ <0,05 | 39,01±4,16 |
| СОД<br>*ЕД/мл/мин* | 1,2±0,16 | 0,629±0,025 | 0,533±0,037 | $P_{1-2}$ <0,05<br>$P_{1-3}$ <0,05<br>$P_{2-3}$ >0,05<br>$P_{1-4}$ <0,05 | 0,563±0,033 |

При анализе активности антиоксидантных ферментов у пациентов с тяжелой ЧМТ было отмечено, что при поступлении происходит повышение активности глутатионпероксидазы (ГП) до 112%, относительно контрольной группы. К 14 суткам у пациентов с благоприятным исходом активность ГП продолжала повышаться, достигая к 8-14 суткам 176% по отношению к контрольной группе. У пациентов с летальным исходом активность ГП на 1-3 сутки была значительно выше, чем у пациентов с благоприятным исходом ЧМТ (табл. 3). Можно предположить, что резкое повышение активности ГП в 1-3 сутки от момента получения черепно-мозговой травмы является прогностически неблагоприятным фактором.

В динамике изменения активности каталазы у пациентов с благоприятными и летальными исходами выраженных различий отмечено не было: в первые сутки у пациентов обеих групп активность каталазы резко повышалась и незначительно изменялась в более поздние периоды (табл. 3).

У пациентов с тяжёлой ЧМТ отмечено существенное снижение активности СОД (табл. 3), которое незначительно отличалось у пациентов обеих групп.

Активность прооксидантного фермента – ксантиноксидазы в крови исследуемых групп пациентов с тяжёлой ЧМТ увеличивалась вне зависимости от возраста пациентов. На 8-14 сутки активность ксантиноксидазы у пациентов 20-39 лет уменьшалась до значений близких к контрольным. В случае летальных исходов на 8-14 сутки от момента получения травмы, уровень ксантиноксидазной активности продолжал увеличиваться (до 420%). Активность ксантиноксидазы в венозной крови достоверно выше у умерших впоследствии пациентов (табл. 4).

Полученные данные указывают на перспективность исследования активности ксантиноксидазы при ЧМТ с прогностической целью. Увеличение активности ксантиноксидазы в первые сутки от момента травмы ассоциировано с приростом большинства продуктов перекисного окисления липидов и тяжестью состояния пациентов, что подтверждает весомый вклад фермента в активацию свободно-радикальных процессов при ЧМТ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, с первых по 14 сутки при тяжёлой ЧМТ отмечены реципрокные отношения между липопероксидацией и окислительной модификацией белков. С 1 по 7 сутки тяжелой ЧМТ происходило увеличение уровня суммарной антиокислительной активности, сопровождающееся

*Таблица 4.* Активность ксантиноксидазы крови в остром периоде ЧМТ.

| Период ЧМТ | Активность ксантиноксидазы (нмоль/мл/мин) | | |
|---|---|---|---|
| | *Пациенты 20-39 лет* | *Пациенты 40-59 лет* | *Пациенты с летальным исходом* |
| Контроль | 0,233±0,018 (n=24) | 0,254±0,023 (n=17) | 0,243±0,021 (n=41) |
| 1-3 сутки | 0,616±0,045* (n=38) | 0,817±0,055* (n=34) | 0,763±0,114* (n=29) |
| 4-7 сутки | 0,598±0,0116 (n=36) | 0,632±0,032* ** (n=35) | 0,896±0,097* (n=21) |
| 8-14 сутки | 0,262±0,033 (n=35) | 0,402±0,044 (n=35) | 1,034±0,154* (n=11) |

Примечание. Активность фермента определяли в цельной, стабилизированной гепарином крови. Данные представлены в виде средней и её стандартной ошибки. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни и Вальда - Вольфовица для независимых групп. * - статистически значимые отличия от значений контрольной группы ($p<0,05$). ** - межвозрастные различия ($p<0,05$).

ростом активности ГП, каталазы на фоне снижения активности СОД, наиболее выраженного на 1-3 сутки у пациентов 20-39 лет. Последнее свидетельствует о необходимости учитывать возраст пациента, локализацию процесса. У пациентов с последующим развитием летальных исходов “среднее” содержание липопероксидов в крови и ликворе было ниже по сравнению с благоприятными исходами. Наступлению летальных исходов предшествовало снижение гептанофильных липопероксидов в сыворотке крови ниже контрольного уровня, а также снижение уровня антиокислительной активности в крови и ликворе, ассоциированного с резким падением активности супероксиддисмутазы и выраженным приростом активности ксантиноксидазы.

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К.* (2008) Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. АРТА, Новосибирск.
2. *Барабой В.А.* (2006) Биоантиоксиданты. Книга плюс, Киев, с. 154-155.
3. *Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И.* (1989) Вопр. мед. химии, **35**(1), 127-129.
4. *Львовская Е.И., Волчегорский И.А., Шемяков С.Е., Лифшиц Р.И.* (1991) Вопр. мед. химии, **37**(4), 92-93.
5. *Львовская Е.И.* (1998) Нарушение процессов липидной пероксидации при термической травме и патогенетическое обоснование лечения антиоксидантами из плазмы крови. Дисс. докт. наук, ЧГМА, Челябинск.
6. *Дубинина Е.Е.* (1995) Вопр. мед. химии, **41**(6), 24-26.
7. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г.* (1988) Лаб. дело, №1, 16-19.
8. *Чевари С., Чаба И., Секей Й.* (1985) Лаб. дело, №11, 678-681.
9. *Hashimoto S.* (1974) Annal. Biochem., **62**, 426-435.
10. *Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переслегина И.А.* (1990) Лаб. дело, №8, 19.
11. *Львовская Е.И., Садова В.А., Сумная Д.Б., Держинский Н.В.* (2010) Вестник Южно-Уральского государственного университета Серия “Образование, здравоохранение, физическая культура”, **6**(182), 82-84.
12. *Дубинина Е.Е.* (2001) Вопр. мед. химии, **47**(6), 561-581.
13. *Dalle-Done I., Aldini D., Carini M.J.* (2006) Cell. Mol. Med., **10**(2), 389-406.
14. *Dalle-Done I., Carini M, Orioli M.* (2009) Free Radic. Biol. Med., **4**, 120-132.
15. *Zitnanova T., Sumegova K., Simko M.* (2007) Clin. Biochem., **4**(8), 567-570.
16. *Держинский Н.В., Львовская Е.И.* (2012) Вестник уральской медицинской академической науки, **2**(39), 38-39.


Поступила: 24. 12. 2013.
Принята к печати: 12. 12. 2015.

## PROGNOSTIC VALUE OF THE PARAMETERS OF FREE RADICAL OXIDATION IN TRAUMATIC BRAIN INJURY

***E.I. Lvovskaya, N.V. Derginskyi, V.A. Sadova, D.B. Symnaya***

Ural State University of Physical Culture,
1 Ordzhonikidze str., Chelyabinsk, 454091 Russia; e-mail: lvovskaya@mail.ru

The dynamics of lipoperoxides content and activity of antioxidant (glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase) and prooxidant (xanthine oxidase) enzymes were investigated in the blood and cerebrospinal fluid of patients with traumatic brain injury of various severity depending on the left- or right-hemisphere localization of injuries. Reciprocal relationship between lipid peroxidation and oxidative modification of proteins from first to 14th day, increase of the level of total antioxidant activity, accompanied with the growth of GP and catalase activity, against the background of decrease in SOD activity from 1 to 7 day have been revealed. Were set lower “average” content of lipid peroxides in the blood and cerebrospinal fluid of patients with the subsequent development of lethal results in compare with cases of favorable outcomes, decrease of geptanofilic lipid peroxides in serum below the reference level, as well as the reduction of antioxidant activity in the blood and cerebrospinal fluid, associated with a sharp falling in superoxide dismutase activity and a significant increase of xanthine oxidase activity, which preceded the lethal results.

**Key words:** free-radical oxidation of lipids and proteins, ferritin, induced lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, xanthine oxidase