

## ОСОБЛИВОСТІ РЕАКЦІЇ ГЛУТАТІОНОВОЇ СИСТЕМИ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ НА ТЛІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПОЛІТРАВМИ

**Резюме.** В умовах сучасної гібридної війни, коли зупинка кровотечі та боротьба з її наслідками визначає подальший успіх у виживанні та реабілітації постраждалого, надзвичайно актуальним є пошук способів, які б покращили метаболізм ішемізованих унаслідок накладання турнікета тканин. Ферменти глутатіонової системи беруть активну участь у боротьбі з наслідками гіпоксії, тому експериментальне виявлення критичних періодів депресії цієї ланки захисту є підґрунтям для подальшого пошуку ефективних методів корекції та стабілізації стану ураженого організму.

**Мета дослідження** – з'ясувати роль глутатіонової системи печінки та нирок у патогенезі експериментальної ішемії – реперфузії (EIP) в ранньому та віддаленому післятравматичному періодах.

**Матеріали і методи.** Об'єктом дослідження стали 196 білих щурів-самців із масою тіла 220–240 г, яких поділили на 4 групи по 10 особин в кожній. Тварини контрольної групи були виведені з дослідження без оперативних втручань, тоді як у дослідних групах було змодельовано травми: накладання кровоспинного джгута на стегно (Дж) протягом двох годин; ізольована крововтрата зі стегнової вени (40 %) – (К); двогодинна ішемія, поєднана з крововтратою (Дж+К), та двогодинна ішемія, поєднана з крововтратою та механічною травмою (Дж+К+П). Тварин виводили з експерименту на 1; 3; 7 та 14 доби після втручань шляхом тотального кровопускання з серця.

**Результати досліджень та їх обговорення.** На тлі активації пероксидного окиснення, що було представлено за показниками зростанням концентрації малонового діальдегіду, дієнових та трієнових кон'югатів, було зафіксовано активну відповідь з боку глутатіонової системи, яка полягала в активації глутатіонпероксидазної активності, незначне підвищення глутатіонредуктазної активності на тлі вираженого зниження концентрації відновленого глутатіону. В тканині нирки активність ферментів глутатіонової системи є дещо нижчою, при цьому в певні періоди, навпаки, перевищують показники печінки. Можна припустити, що причиною такого розподілу показників є тотальне виснаження глутатіонової системи в найбільш критичний щодо відновлення період – на 1 та 3 доби, що визначалося тяжкістю травми. При цьому навіть ізольоване накладання кровоспинного джгута призводило до значних зрушень з боку глутатіонової системи у відповідь на активізацію пероксидного окиснення ліпідів, що підтверджує необхідність продовження серії дослідів.

**Висновки.** Отримані результати експериментів встановили суттєве пригнічення концентрації відновленого глутатіону (ВГ) – у печінці й дещо слабше – в нирках, а також зростання глутатіонпероксидазної та глутатіонредуктазної активності. Особливо виражена депресія активності була на тлі кровотечі, поєднаної з ішемією, та кровотечі, поєднаної з ішемією та механічною травмою. Що стосується ГП та ГР, то їхня активність знижувалася відповідно до наростання показників пероксидного окиснення ліпідів.

**Ключові слова:** ішемія; кровотеча; механічна травма; глутатіонова система.

**ВСТУП** Зменшення кількості відновленого глутатіону є маркером оксидативного стресу [3] на тлі надміру продукції вільних радикалів. Активний відновник глутатіон відіграє важливу роль у процесах детоксикації [2]. На тлі різних ушкоджувальних факторів концентрація компонентів системи глутатіону є неідентичною і в різних органах [4], а посилення розпаду глутатіону, як відомо, зростає разом зі збільшенням кількості пероксидів з віком [1]. Зокрема, тривале застосування джгута з метою тимчасового припинення кровотечі, а саме процеси, що запускаються в організмі після його зняття, можуть ініціювати механізми, схожі до тих, які розвиваються при синдромі довготривалого стискання [5]. Оскільки печінка та нирки є органами, які найактивніше беруть участь у процесах детоксикації, то зниження ферментативної активності в них глутатіонової системи може створити додаткові ускладнення на тлі вже ослабленої резистентності організму. Як відомо, система глутатіону бере безпосередню участь в знешкодженні вільних радикалів [6], та задіяна в процесах репарації ушкоджених макромолекул. У літературі, доступній нам, відсутні дані, що підтверджують депресію глутатіонової системи на тлі турнікетного синдрому [7, 8]. Зважаючи на безпосередню роль її ферментів у боротьбі з наслідками активації пероксидного окиснення ліпідів у результаті ішемічних змін, що розвиваються внаслідок застосування джгута, ми відтворили стан ішемії-реперфузії в експериментальних умовах. Вивчення стану цієї цитопротекторної системи в умовах експериментальної ішемії-реперфузії є дуже

перспективним, оскільки відкриває шлях до більш глибокого розуміння патогенетичних механізмів бойової травми і можливостей впливу на неї.

**Метою дослідження** було з'ясувати роль глутатіонової системи печінки та нирок у патогенезі експериментальної ішемії-реперфузії (EIP) в ранньому та віддаленому післятравматичному періодах.

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** В експерименті використано 196 нелінійних білих щурів-самців масою 220–240 г. Їх поділили на 4 групи – по 10 тварин у кожній. Тварини контрольної групи були виведені з дослідження без оперативних втручань, тоді як у дослідних групах було змодельовано такі травми: накладання кровоспинного джгута на стегно на 2 год (Дж); ізольована крововтрата зі стегнової вени (40 %) – (К); двогодинна ішемія за допомогою джгута, поєднана з крововтратою (Дж+К), та двогодинна ішемія, поєднана з крововтратою та механічною травмою (Дж+К+П). Тварин виводили з експерименту на 1; 3; 7 та 14 доби після втручань шляхом тотального кровопускання з серця. Активність глутатіонпероксидази визначали за методом, описаним Г. О. Кругліковою та У. М. Штутманом. Глутатіонредуктазну активність визначали за кількістю НАДФ·Н, що використовується у ферментативній реакції відновлення окисненого глутатіону, а відновлений глутатіон – за методикою G. L. Ellman. Статистичну обробку здійснено за методом Стьюдента; статистично достовірними вважали результати, для яких  $p \leq 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ** У печінці на всіх етапах забору матеріалу, на 1; 3; 17 та

14 доби рівень ГП був увесь час суттєво і різною мірою підвищений, порівняно з контрольною групою; середні показники – в 4 та 6 разів (табл. 1). І тільки на тлі ізолюваної ішемії – реперфузії (Дж) на 14 добу відзначено поступове зниження активності цього ферменту, коли він перевищив початковий рівень лише на 57 %.

У нирках вміст ГП теж у всі дослідні періоди був суттєво підвищений. Однак звертає на себе увагу, що на тлі Дж+К та на тлі Дж+П+К на 1 та на 3 доби після травми зростання активності ферменту практично не відбулося, що свідчить про активну мобілізацію антиоксидантної системи в даний період і, ймовірно, про її пригнічення неадекватним збільшенням продуктів перексидного окиснення ліпідів. Подібною динаміка була у цих же групах в аналогічному періоді – на 3 добу в печінці.

Що стосується ГР в печінці, то, як видно із даних, наведених в таблиці 2, на тлі Дж активність ферменту залишалася практично на незмінному рівні протягом 7 діб (зростання на 3–6 % порівняно з контролем) і лише на 14 добу після зняття турнікета – на тлі зменшення активності ГП – відзначено зменшення активності в 4,5 раза. При цьому в нирках з 1 до 7 доби зафіксовано зростання концентрації ГР в 2 рази, тоді як на 14 добу рівень ГР перевищив початковий лише на 21 %. Отже, на тлі ізолюваної ішемії-реперфузії рівень ГР починає стабілізуватися, але якщо в печінці його концентрація виснажується, то в нирках, порівняно з попередніми добами, суттєво знижується, та все ще не повертається до норми.

На тлі ізолюваної К динаміка була мінливою, але з тенденцією до зниження. Так, рівень показника зменшився в 6 разів нижче контролю на 1 добу, після чого на 3 добу повернувся до норми (вище її на 19 %). 7 доба виявилася критичною, оскільки рівень активності знову знизився в 2,5 раза, порівняно з контролем, і утримувався на такому рівні й на 14 добу. Критичний період для групи Дж+К наступав раніше – на 1 і 3 доби, коли рівень ГР був нижчим від початкового майже в 3 та в 2 рази відповідно, тоді як на 7 добу повернувся до норми і залишався вищим початкового рівня на 16,7 та на 18,4 % на 7 та 14 доби відповідно.

Динаміка ГР у нирках є аналогічною до такої ж на тлі Дж, коли рівень ферменту перевищував початковий рівень у 5; 3,3; 1,4 раза та на 36 % на 1; 3; 7 та 14 доби відповідно. Це вказує на те, що в нирках механізми конт\_ролю за активністю ПОЛ є більш потужні або ПОЛ відбувається не настільки інтенсивно як в печінці.

Для тварин із групи Дж+К+П критичною була 3 доба, коли рівень ГР знизився відносно початкового в 3,3 раза. При цьому на 1,7 та 14 доби він був на рівні норми, незначно перевищуючи її, на 19,1; на 22,2 та 9,5 % відповідно.

Згідно з результатами, наведеними у таблиці 3, концентрація ВГ на 1 добу після травми змінювалася дуже яскраво: зниження в 5,2; 9,95 та 5,1 раза та тлі Дж, К та Дж+К+П відповідно. При цьому на тлі Дж+К зменшення, порівняно з початковим, виявилось найбільш вираженим – в 26,4 раза. Аналогічною була динаміка на 3 та на 7

Таблиця 1. Динаміка глутатіонпероксидази тканин печінки та нирки у відповідь на ішемію – реперфузію та політравму (M±m)

Показник	Група	Контроль (n=36)	Доба посттравматичного періоду			
			1 (n=40)	3 (n=40)	7 (n=40)	14 (n=40)
Печінка	Ізолювана ішемія – реперфузія	0,089±0,004 (n=16)	0,653±0,003	0,637±0,003	0,650±0,002	0,140±0,003
	Ізолювана кровотеча		0,566±0,004	0,446±0,003	0,464±0,003	0,476±0,004
	Ішемія+кровотеча		0,174±0,003	0,221±0,004	0,669±0,003	0,471±0,002
	Ішемія+кровотеча+перелом		0,532±0,004	0,197±0,002	0,438±0,003	0,455±0,005
p			<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Нирки	Ізолювана ішемія – реперфузія	0,168±0,009 (n=16)	0,466±0,004	0,433±0,004	0,532±0,006	0,146±0,005
	Ізолювана кровотеча		0,953±0,01	0,361±0,003	0,851±0,006	0,872±0,005
	Ішемія+кровотеча		0,202±0,003	0,198±0,003	0,436±0,004	0,434±0,004
	Ішемія+кровотеча+перелом		0,461±0,004	0,125±0,005	0,464±0,004	0,463±0,005
p			<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Таблиця 2. Динаміка глутатіонпероксидази тканин печінки та нирки у відповідь на ішемію – реперфузію та політравму (M±m)

Показник	Група	Контроль (n=36)	Доба посттравматичного періоду			
			1 (n=40)	3 (n=40)	7 (n=40)	14 (n=40)
Печінка	Ізолювана ішемія – реперфузія	0,580±0,003 (n=16)	0,598±0,002	0,615±0,003	0,640±0,002	0,128±0,004
	Ізолювана кровотеча		0,095±0,003	0,691±0,001	0,237±0,005	0,234±0,006
	Ішемія+кровотеча		0,199±0,004	0,348±0,002	0,677±0,005	0,687±0,004
	Ішемія+кровотеча+перелом		0,691±0,004	0,176±0,002	0,709±0,006	0,635±0,002
p			<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Нирки	Ізолювана ішемія – реперфузія	0,151±0,002 (n=16)	0,464±0,005	0,440±0,006	0,517±0,006	0,183±0,004
	Ізолювана кровотеча		0,873±0,006	0,492±0,004	0,210±0,004	0,206±0,004
	Ішемія+кровотеча		0,199±0,004	0,241±0,006	0,553±0,005	0,477±0,006
	Ішемія+кровотеча+перелом		0,492±0,003	0,202±0,004	0,566±0,005	0,579±0,006
p			<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Таблиця 3. Динаміка відновленого глутатіону тканин печінки та нирки у відповідь на ішемію – реперфузію та політравму (M±m)

Показник	Група	Контроль (n=36)	Доба посттравматичного періоду			
			1 (n=40)	3 (n=40)	7 (n=40)	14 (n=40)
Печінка	Ізольована ішемія – реперфузія	4,350±0,01 (n=16)	0,834±0,002	0,845±0,004	3,340±0,005	0,463±0,008
	Ізольована кровотеча		0,437±0,008	0,651±0,003	0,234±0,004	0,320±0,003
	Ішемія+кровотеча		0,165±0,003	0,750±0,002	2,436±0,02	0,748±0,004
	Ішемія+кровотеча+перелом		0,859±0,004	0,530±0,002	2,869±0,002	2,818±0,03
P			<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Нирки	Ізольована ішемія – реперфузія	5,083±0,02 (n=16)	1,702±0,005	1,694±0,004	3,333±0,03	0,215±0,003
	Ізольована кровотеча		0,115±0,004	0,470±0,004	0,141±0,05	0,232±0,02
	Ішемія+кровотеча		0,160±0,004	0,498±0,008	2,519±0,02	0,477±0,004
	Ішемія+кровотеча+перелом		1,470±0,005	0,394±0,004	1,342±0,02	1,357±0,01
p			<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

добу, проте на тлі всіх видів травми, окрім ізольованої крововтрати, коли рівень ГР був нижчим за контроль у 18 разів, зменшення було незначним, порівняно з контролем, нижче в 1,3; 1,8 та 1,5 раза відповідно.

Що стосується 14 доби, то рівень ВГ у жодній з експериментальних груп не повернувся до норми, залишаючись в рази нижчим від контролю, що свідчить, очевидно, про активні відновні процеси для боротьби із наслідками перексидного окиснення ліпідів. Найбільш вираженим зниження було на тлі ізольованого застосування джгута та крововтрати – в 9,4 та 13,6 раза відповідно.

Зменшення концентрації ВГ у нирках відбувалося теж, однак менш інтенсивно. Виняток становила 14 доба на тлі Дж, коли він знизився в 23,6 раза порівняно з початковим рівнем. На тлі ізольованої кровотечі зниження концентрації в рази перевищувало аналогічні показники в печінці, а також початковий рівень. При цьому концентрація ВГ на тлі Дж+К+П була практично ідентичною до аналогічної в нирках, хоча і перевищуючи її.

**ВИСНОВКИ** Реакція на крововтрату та застосування джгута була мінливою, залежно від додаткових факторів, з якими поєднувалася ішемія. При цьому встановлено наступні закономірності: відповідно до періодів активації процесів перексидного окиснення ліпідів (визначення за рівнем малонового діальдегіду, дієнових та трієнових кон'югатів) відзначено виснаження функціональних можливостей системи глутатіону. При цьому навіть ізольоване застосування турнікета протягом 2 год викликало не менші аналогічні зміни, як і на тлі крововтрати та крововтрати з турнікетом. Загалом же, інтенсивність процесів була суттєво вищою в тканинах печінки, і тільки зниження концентрації ВГ у нирках, порівняно з аналогічними періодами на тлі різних видів політравми, різко перевищувало показники в печінці.

**Перспективи подальших досліджень** Актуальним є подальший пошук причин цих біохімічних зрушень, міжтканинних відмінностей та їхньої ролі в реалізації цитотоксичних проявів турнікетного синдрому.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабак О. Я. Глутатин в норме и при патологии: биологическая роль и возможности клинического применения / О. Я. Бабак // Здоров'я України. 2015. – № 1. – С. 10.
2. Толпыгина О. А. Роль глутатина в системе антиоксидантной защиты / О. А. Толпыгина // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – № 2 (84), Ч. 2. – С. 178–180.
3. Состояние системы глутатиона и перекисного окисления липидов в тканях печени и почек крыс при острых отравлениях циклофосфаном / В. А. Кашуро, А. И. Карпищенко, С. И. Глушков [и др.] // Нефрология. – 2006. – Т. 10, № 2. – С. 81–85.
4. Смирнов Л. П. Роль глутатиона в функционировании систем антиоксидантной защиты и биотрансформации / Л. П. Смирнов, И. В. Суховская // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. – № 6. – 2014. – С. 34–40.
5. Интернет-ресурс <http://www.medsanbat.info/post-turniketnyi-sindrom-2/>
6. Тиунов Л. А. Механизмы естественной детоксикации и антиоксидантной защиты / Л. А. Тиунов // Вестник РАМН, 1995. – № 3. – С. 9–13.
7. Mabry R. L. Tourniquet use on the battlefield / R. L. Mabry // Mil. Med. – 2006. – № 171. – P. 352–356.
8. Джон Ф. Крех. Тривале (упродовж 16 годин) застосування джгута в умовах бойового поранення : Клінічний випадок та огляд актуальної літератури / Джон Ф. Крех, Девід Дж. Бає, Томас Джей Уолтерс // Интернет-ресурс "Проект Віктора та Олени Пінчук". – 8.11.2014 <http://www.medsanbat.info/16-godinne-vikoristannya-dzhguta/>
9. Владимиров Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. – М. : Медицина, 1972. – 252 с.
10. Колесова О. Е. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах / О. Е. Колесова, А. А. Маркин, Т. Н. Федорова // Лабораторное дело. – 1984. – № 9. – С. 540–546.
11. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch of Bioch. and Biophys. – 1959. – № 82. – P. 70–77.
12. Круглікова Г. О. Методи визначення активності глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази / Г. О. Круглікова, У. М. Штутман // Український біохімічний журнал. – 1976. – Т. 68, № 2. – С. 223–228.

Отримано 04.04.18

## FEATURES OF GLUTATHYON SYSTEM REACTION OF INTERNAL ORGANS ON THE BACKGROUND OF EXPERIMENTAL POLYTRAUMA

**Summary.** Nowadays stop the bleeding and fight against its consequences determines further success in the survival and rehabilitation of the victim. It is extremely important to find ways to improve the ischemic metabolism as a result of overlaying a tissue turnstile. Enzymes of the glutathione system are actively involved in combating the effects of hypoxia, therefore, the experimental detection of critical periods of depression of this protectional link is the basis for the further search for effective methods of correction and condition stabilization of the affected organism.

**The aim of the study** – to determine the role of glutathione system of the liver and kidneys in the pathogenesis of experimental ischemia-reperfusion (EIR) in the early and remote post-traumatic periods.

**Materials and Methods.** The object of the study – 196 males of white male rats with a body weight 220–240 g, divided into 4 groups, 10 individuals in each. Animals of the control group were withdrawn from the study without surgical intervention, while in the experimental groups, injuries were simulated: a hemostatic tourniquet on the thigh (J) over two hours; isolated blood loss from the femoral vein (40%) – (K); two-hour ischemia, combined with blood loss (J + K) and two-hour ischemia, combined with blood loss and mechanical trauma (J + K + P). The animals were withdrawn from the experiment at 1, 3, 7 and 14 days after the intervention by total bleeding from the heart.

**Results and Discussion.** According to the activation of the lipid peroxidation, which was represented by the growth of the concentration of malonic dialdehyde, diene and trienic conjugates, an active response from the glutathione system was detected: the activation of glutathioneperoxidase activity, an increase of glutathionereductase activity against the decrease restored glutathione concentration. But in the kidney tissue the activity of glutathione system enzymes was somewhat lower, herewith in some periods, conversely, they exceeded liver parameters. These results, in our opinion, indicate that the reason of such their dividing, mainly, it is total debilitation of the glutathione system in the posttraumatological period. It was 1 and 3 days after trauma and partly depended of the injury severity. At the same time, even an isolated overlay of the hemostatic tourniquet led to significant changes of the glutathione system and was represented by response to the activation of lipid peroxidation. This confirms the necessity to continue the series of experiments.

**Conclusions.** The obtained results of the experiments revealed a significant inhibition of the reduced glutathione concentration in the liver, and no so expressed in the kidneys. Especially depression of its activity was on the background of bleeding associated with ischemia, and bleeding associated with ischemia and mechanical trauma. Decrease of glutathioneperoxidase and glutathionereductase activity coincided with increase of lipid peroxidation.

**Key words:** ischemia; bleeding; mechanical trauma; glutathione system.

## ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ГЛУТАТИОНОВОЙ СИСТЕМЫ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПОЛИТРАВМЫ

**Резюме.** В условиях современной гибридной войны, когда остановка кровотечения и борьба с его последствиями определяет дальнейший успех в выживании и реабилитации пострадавшего, чрезвычайно актуальным является поиск способов, которые улучшили метаболизм тканей, пребывающих в состоянии ишемии вследствие наложения турникета. Ферменты глутатионовой системы активно участвуют в борьбе с последствиями гипоксии, поэтому экспериментальное обнаружение критических периодов депрессии этого звена защиты является основой для дальнейшего поиска эффективных методов коррекции и стабилизации состояния пораженного организма.

**Цель исследования** – выяснить роль глутатионовой системы печени и почек в патогенезе экспериментальной ишемии – реперфузии (ЭИР) в раннем и отдаленном посттравматическом периодах.

**Материалы и методы.** Объектом исследования стали 196 белых крыс-самцов с массой тела 220–240 г, которых поделили на 4 группы по 10 особей в каждой. Животные контрольной группы были выведены из исследования без оперативных вмешательств, тогда как в опытных группах была смоделирована травмы: наложение кровоостанавливающего жгута на бедро (Дж) в течение двух часов; изолированная кровопотеря из бедренной вены (40 %) – (К); двухчасовая ишемия, соединенная с кровопотерей (Дж+К), и двухчасовая ишемия, соединенная с кровопотерей и механической травмой (Дж+К+П). Животных выводили из эксперимента на 1; 3; 7 и 14 сутки после вмешательств путем тотального кровопускания из сердца.

**Результаты исследований и их обсуждение.** На фоне активации пероксидного окисления, что было представлено увеличением концентрации малонового диальдегида, диеновых и триеновых конъюгатов, было зафиксировано активный ответ со стороны глутатионовой системы, который заключался в: активации глутатионпероксидазной активности, глутатионредуктазной активности на фоне выраженного снижения концентрации восстановленного глутатиона. В ткани почки активность ферментов глутатионовой системы несколько ниже, при этом в определенные периоды – наоборот превышают показатели печени. Можно предположить, что причиной такого распределения показателей является тотальное истощение глутатионовой системы в наиболее критический по восстановлению период – на 1 и 3 сутки, что определялось тяжестью травмы. При этом даже изолированное наложение кровоостанавливающего жгута приводило к значительным сдвигам со стороны глутатионовой системы в ответ на активизацию пероксидного окисления липидов, что подтверждает необходимость продолжения серии опытов.

**Выводы.** Полученные результаты экспериментов установили существенное угнетение концентрации восстановленного глутатиона (ВУ) – в печени и несколько слабее – в почках и увеличение глутатионпероксидазной, глутатионредуктазной активности. Особенно выраженная депрессия активности была на фоне кровотечения соединенной с ишемией, и кровотечения, соединенного с ишемией и механической травмой. Что касается активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, то ее снижение совпадало с периодом увеличения пероксидного окисления липидов.

**Ключевые слова:** ишемия; кровотечение; механическая травма; глутатионовая система.