

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

КОРРЕКЦИЯ БЕЛКОВО-ЛИПИДНОГО СОСТАВА МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РАСПРОСТРАНЕННОМ ГНОЙНОМ ПЕРИТОНИТЕ

В. А. Косинец¹, С. С. Осочук², Н. Н. Яроцкая²

Исследование проведено на кроликах породы Шиншилла. Установлено, что развитие распространенного гнойного перитонита сопровождается выраженными изменениями белково-липидного состава митохондрий печени. Проведен сравнительный анализ применения метаболических средств цитофлавина и неотона с целью устранения патологических отклонений в структуре митохондрий печени. Цитофлавин эффективнее предотвращает снижение содержания общего количества фосфолипидов и холестерина в мембранах митохондрий, что в совокупности со стимуляцией роста содержания белка указывает на высокие протекторные свойства препарата, которые позволяют сохранить функциональный потенциал митохондрий печени в условиях экспериментального распространенного гнойного перитонита.

Ключевые слова: распространенный гнойный перитонит, цитофлавин, неотон, печень, митохондрии, фосфолипиды, холестерол

ВВЕДЕНИЕ

Нарушение структурно-функциональной целостности биологических мембран лежит в основе многих патологических процессов [4, 10, 16].

Основными составляющими липидного бислоя являются фосфолипиды и холестерол, изменение соотношения которых влияет на физико-химические свойства мембран, активность встроенных ферментных систем [1]. Формируя гидрофобную защитную среду, липиды регулируют конформацию белков, выступают в роли кофакторов ферментов, участвуют в ионно-обменном и субстратном транспорте [11]. Молекулы холестерина обеспечивают стабильность мембран, определяя параметры их “текучести” [22].

Энергозависимость многочисленных метаболических процессов, протекающих в клетке, определяет центральное значение эффективности окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ в митохондриях. Функционирование митохондриального аппарата имеет неразрывную связь с интегральной целостностью его структурных компонентов, важнейшими из которых являются липиды [15, 16].

Воздействие повреждающих факторов может приводить как к компенсаторной, так и к патологической модификации липидного соотношения мембран. Энер-

годефицит в результате нарушения процесса окислительного фосфорилирования и активация на его фоне перекисного окисления липидов, рост активности фосфолиполизы А2 вызывают каскад патологических реакций, повреждение мембранной структуры митохондрий, апоптоз клетки [12, 17].

Одним из ведущих факторов повреждения митохондрий является гиперактивация свободнорадикальных процессов. Избыточное образование активных форм кислорода способствует дестабилизации молекул липидов, росту неспецифической протонной проницаемости мембран с выравниванием трансмембранного потенциала. Утрата барьерной функции приводит к увеличению внутриклеточной концентрации ионов кальция, активации фосфолипаз и накоплению свободных жирных кислот, лизофосфатидов, способных оказывать повреждающее действие на структуру мембран [6, 7, 20].

Нарушение барьерной функции печени при распространенном гнойном перитоните является важным фактором развития сепсиса и полиорганной недостаточности. В связи с этим представляется актуальным изучение в условиях экспериментального перитонита изменения белково-липидного состава митохондрий печени, а также возможности ее коррекции.

В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ применения с данной целью метаболических средств — цитофлавина и неотона.

Цитофлавин — раствор для инфузий, активными компонентами которого являются янтарная кислота, никотинамид, рибоксин, рибофлавин. Многокомпонентный состав препарата предполагает возможность разнонаправленного действия на метаболические про-

¹ Кафедра общей хирургии (зав. — акад. РАМН В. К. Гостищев) Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, 109240, Москва, ул. Яузская, 11.

² Центральная научно-исследовательская лаборатория (зав. — С. С. Осочук) Витебский государственный медицинский университет, 210602, Витебск, пр-т Фрунзе, 27.

цессы, в частности, дыхание и окислительное фосфорилирование в клетках, а также стимуляцию системы антиоксидантной защиты [2].

Неотон — аналог естественного метаболита организма фосфокреатина, который является буферным соединением, поставляющим фосфатную группу АДФ с целью повторного синтеза универсального источника энергии АТФ [9].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 55 кроликах-самцах породы Шиншилла, массой 2,6 – 3 кг. Животные были разделены на следующие группы: I — интактные ($n = 5$); II — 6-ти часовой распространенный гнойный перитонит без хирургического лечения ($n = 5$); III — контрольная, хирургическое лечение перитонита ($n = 15$); IV — хирургическое лечение перитонита с применением в послеоперационном периоде цитофлавина ($n = 15$); V — хирургическое лечение перитонита с применением в послеоперационном периоде неотона ($n = 15$).

Перитонит моделировали путем интраабдоминального введения аэробно-анаэробной взвеси *E.coli* (штамм 0111 K58 НИ С 130-53) и *B.Fragilis* (штамм 323) из расчета 6 млрд микробных тел на 1 кг массы кролика. Через 6 ч после введения микроорганизмов в III, IV и V группах животных с целью лечения перитонита и устранения энтеральной недостаточности выполняли лапаротомию, санацию брюшной полости, декомпрессию тонкой кишки. Животным IV и V групп в послеоперационном периоде (в течение 5-ти суток) ежедневно внутривенно капельно вводили цитофлавин (28,6 мг янтарной кислоты на 1 кг массы) и неотон (0,05 г на 1 кг массы) соответственно, животным III группы — эквивалентный объем 0,9 %-ного раствора натрия хлорида. Животных с распространенным гной-

ным перитонитом выводили из эксперимента (летальная доза этаминал-натрия) через 6 ч после заражения, III, IV и V групп — на 1-е, 3-и и 5-е сутки после операции.

Выделение митохондрий печени выполняли по методу Johnson-Lardy [14]. Экстракцию фосфолипидов (ФЛ) митохондриальных мембран осуществляли последовательно смесью хлороформ/метанол (1:2 по объему) и смесью хлороформ/метанол/вода (1:2:0,8 по объему) согласно методике М. Кейтс [5]. Суммарную концентрацию ФЛ митохондрий печени измеряли после минерализации экстракта по реакции с молибдатом аммония и аскорбиновой кислотой по стандарту неорганического фосфата [8, 19]. Белок определяли биуретовым методом [13].

Статистическую обработку данных проводили с использованием электронных пакетов анализа Statistica 6.0 и Excel. Поскольку распределение признаков носило правильный характер, а дисперсии в сравниваемых группах не отличались, были использованы методы описательной статистики, *t*-критерий Стьюдента (уровень достоверности отличий средних значений $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через 6 ч после инициации распространенного гнойного перитонита в митохондриях печени наблюдалось статистически достоверное по сравнению с нормой снижение содержания общих фосфолипидов (ОФЛ) и холестерина (ХС) (в отношении на 1 грамм белка) с $27,37 \pm 1,24$ и $12,51 \pm 0,78$ до $17,23 \pm 1,4$ ($p_1 < 0,001$) и $5,28 \pm 1,48$ ($p_1 < 0,001$) соответственно. В то же время отмечался рост соотношения ОФЛ/ХС ($p_1 < 0,05$), которое составило $3,33 \pm 0,88$ (таблица).

Полученные данные свидетельствуют о наличии глубоких изменений липидного состава митохондрий уже в первые часы экспериментального перитонита.

Динамика белково-липидного состава мембран митохондрий печени в послеоперационном периоде при экспериментальном распространенном гнойном перитоните ($n = 5$)

Показатель	Группа										
	1. Норма	2. 6-часовой перитонит	3. Контрольная			4. С применением неотона			5. С применением цитофлавина		
			1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки	1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки	1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки
ХС/г белка	$12,51 \pm 0,78$	$5,28 \pm 1,48$ $p_1 < 0,001$	$6,33 \pm 0,52$ $p_1 < 0,001$	$7,63 \pm 0,41$ $p_1 < 0,001$	$8,51 \pm 0,13$ $p_1 < 0,001$	$7,14 \pm 0,42$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	$10,06 \pm 1,99$ $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	$9,36 \pm 0,80$ $p_1 < 0,001$ $p_3 < 0,05$	$8,76 \pm 2,03$ $p_1 < 0,01$ $p_3 < 0,05$	$11,52 \pm 0,73$ $p_3 < 0,001$	$10,37 \pm 0,36$ $p_1 < 0,001$ $p_3 < 0,001$ $p_4 < 0,05$
ОФЛ/г белка	$27,37 \pm 1,24$	$17,23 \pm 1,40$ $p_1 < 0,001$	$19,66 \pm 0,71$ $p_2 < 0,01$	$20,99 \pm 1,40$ $p_1 < 0,001$	$23,50 \pm 0,64$ $p_1 < 0,001$	$23,18 \pm 1,21$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$	$26,00 \pm 0,83$ $p_3 < 0,001$	$24,85 \pm 0,99$ $p_1 < 0,01$ $p_3 < 0,05$	$24,32 \pm 2,92$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$	$26,36 \pm 1,48$ $p_3 < 0,001$	$26,37 \pm 1,14$ $p_3 < 0,01$
ОФЛ/ХС	$2,19 \pm 0,15$	$3,33 \pm 0,88$ $p_1 < 0,05$	$3,13 \pm 0,38$ $p_1 < 0,001$	$2,75 \pm 0,15$ $p_1 < 0,001$	$2,76 \pm 0,11$ $p_1 < 0,001$	$3,25 \pm 0,23$ $p_1 < 0,001$	$2,67 \pm 0,57$	$2,66 \pm 0,14$ $p_1 < 0,01$	$2,83 \pm 0,33$ $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,05$	$2,29 \pm 0,17$ $p_3 < 0,01$	$2,55 \pm 0,18$ $p_1 < 0,05$
Белок	$4,02 \pm 0,71$	$4,8 \pm 0,32$	$4,32 \pm 0,86$	$4,16 \pm 0,25$	$3,36 \pm 0,32$	$4,38 \pm 0,46$	$4,60 \pm 0,77$	$5,3 \pm 1,04$ $p_3 < 0,01$	$4,4 \pm 0,68$	$4,64 \pm 1,12$	$6,44 \pm 1,4$ $p_1 < 0,01$ $p_3 < 0,01$

Примечание. Различия значимы по сравнению: p_1 — с нормой; p_2 — с группой 6-часовой перитонит; p_3 — с группой без лечения аналогичных суток; p_4 — с группой “Неотон” аналогичных суток. n — число животных в группах.

На 1-е сутки послеоперационного периода содержание ХС было практически в 2 раза ниже нормы — $6,33 \pm 0,52$ ($p_1 < 0,001$). Статистически достоверно до $19,66 \pm 0,71$ ($p_1 < 0,001$) увеличилось количество ОФЛ. Отношение ОФЛ/ХС по-прежнему были выше, чем у интактных животных ($p_1 < 0,001$).

На 3-и сутки после операции изучаемые показатели практически не отличались от предыдущего срока исследований. Исключение составило лишь содержание ОФЛ, количество которых было ниже, чем у интактных животных и, вероятно из-за дисперсии признака, не отличалось от предыдущих сроков наблюдений.

На 5-е сутки послеоперационного периода исследуемые показатели по-прежнему достоверно отличались от нормы. Уровень ХС составил $8,51 \pm 0,1$ ($p_1 < 0,001$), ОФЛ и ОФЛ/ХС — $23,5 \pm 0,64$ ($p_1 < 0,001$) и $2,76 \pm 0,11$ ($p_1 < 0,001$) соответственно.

Таким образом, во все сроки исследований отмечены однотипные изменения липидных компонентов митохондрий печени. Содержание белка при этом не претерпело значимых изменений.

На 1-е сутки послеоперационного периода на фоне применения цитофлавина содержание ХС было ниже нормы ($p_1 < 0,01$), но достоверно выше по сравнению с контрольной группой ($p_3 < 0,05$) — $8,76 \pm 2,03$. Уровень ОФЛ снизился незначительно и составил $24,32 \pm 2,92$. Отношение ОФЛ/ХС было достоверно выше, чем у здоровых животных — $2,83 \pm 0,33$ ($p_1 < 0,05$) и не отличалось от показателя контрольной группы. Количество белка составило $4,4 \pm 0,68$.

Таким образом, на первые сутки после операции цитофлавин минимизировал снижение содержания холестерина и общих фосфолипидов, не оказав достоверного влияния на их соотношение.

На 3-и сутки послеоперационного периода цитофлавин нормализовал содержание ОФЛ и ХС. Отмечено достоверное по сравнению с контрольной группой увеличение содержания ХС и ОФЛ — $11,52 \pm 0,73$ ($p_3 < 0,001$) и $26,36 \pm 1,48$ ($p_3 < 0,001$) соответственно. Наблюдалось также статистически значимое снижение по сравнению с контрольной группой отношения ОФЛ/ХС до $2,29 \pm 0,17$ ($p_3 < 0,01$).

На 5-е сутки после операции содержание ХС было ниже, чем у интактных животных — $10,37 \pm 0,36$ ($p_1 < 0,001$), но достоверно ($p_1 < 0,001$) выше, чем у животных без применения препарата. Содержание ОФЛ не отличалось от нормы и значительно превышало показатель контрольной группы — $26,37 \pm 1,14$ ($p_3 < 0,01$). Отношение ОФЛ/ХС было выше, чем у здоровых животных, и составило $2,55 \pm 0,18$ ($p_1 < 0,05$). На фоне цитофлавина отмечалось значительное (на 50,2 %) увеличение количества белка как по сравнению с интактными животными, так и с контрольной группой, — $6,44 \pm 1,4$ ($p_1 < 0,01$ и $p_3 < 0,01$ соответственно).

Учитывая, что активными компонентами цитофлавина являются субстрат цикла трикарбоновых кислот янтарная кислота, обладающая способностью регулировать активность данного цикла, и предшественники кофакторов ферментов дыхательной цепи никотинамид и рибофлавин, можно предположить, что рост содержания белка свидетельствует об увеличении функциональной активности митохондрий.

Таким образом, во все сроки исследований цитофлавин оказывал защитное действие на липидный состав митохондрий печени, способствуя также увеличению содержания белка на 5-е сутки послеоперационного периода.

Динамика изменений исследуемых показателей митохондрий печени группы животных, которые получали неонто, во все сроки исследований была сходна с таковой при применении цитофлавина, однако, менее выраженной.

На 1-е сутки послеоперационного периода отношение ОФЛ/ХС было достоверно выше ($p_4 < 0,05$), чем при применении цитофлавина, и составило $3,25 \pm 0,23$. Содержание ХС статистически значимого отличия не имело — $7,14 \pm 0,42$. Уровень ОФЛ и белка был равен $23,18 \pm 1,21$ и $4,38 \pm 0,46$ соответственно.

На 3-и сутки после операции содержание ХС было ниже по сравнению с нормой ($p_1 < 0,05$), но выше, чем в группе без лечения ($p_3 < 0,05$), — $10,06 \pm 1,99$. Содержание ОФЛ увеличилось по сравнению с контрольной группой до $26 \pm 0,83$.

На 5-е сутки послеоперационного периода содержание ХС оставалось достоверно ниже, чем при применении цитофлавина — $9,36 \pm 0,8$ ($p_4 < 0,05$), но выше, чем в контрольной группе ($p_3 < 0,05$). Уровень ОФЛ превысил содержание в группе контроля ($p_3 < 0,05$), но не достиг показателя интактных животных — $24,85 \pm 0,99$ ($p_1 < 0,01$). Соотношение ОФЛ/ХС составило $2,66 \pm 0,14$ и достоверно превышало норму ($p_1 < 0,01$). Количество белка было равным $5,3 \pm 1,04$ и статистически значимо не отличалось от уровня группы животных, которые получали цитофлавин.

Развитие у животных 6-часового распространенного гнойного перитонита характеризуется дисбалансом белково-липидного соотношения в митохондриях печени. Рост отношения ОФЛ/ХС может отражать увеличение текучести мембран, что в свою очередь, способно оказывать влияние на конформацию встроенных белковых молекул и, как следствие, их функциональную активность. Из исследований, проведенных на эритроцитарных мембранах, известно, что их анионная проницаемость обратно пропорциональна содержанию холестерина и сфингомиелина [19]. Если такие выводы справедливы и для митохондриальных мембран, можно предположить, что увеличение соотношения ОФЛ/ХС может отражать рост анионной проницаемости митохондриальных мембран и нарушение образования трансмембранного потенциала. Сниже-

ние содержания ОФЛ и ХС, вероятно, способствует снижению микровязкости и увеличивает способность белков к латеральной диффузии, поскольку белки в присутствии холестерина занимают области мембраны, обедненные стероидом [3]. Известно, что холестерол легко встраивается в зоны дефектов липидного бислоя мембран, предотвращая тем самым их деструкцию. Кроме того, ХС способен активировать обмен АТФ/АДФ в митохондриях, поэтому снижение его содержания, вероятно, способно привести к снижению продукции АТФ [15]. Таким образом, низкий уровень ХС и ОФЛ можно расценить как негативное воздействие воспалительного процесса на состав мембран митохондрий, способное снизить их функциональную активность.

Применение в послеоперационном периоде при экспериментальном распространенном гнойном перитоните метаболических средств цитофлавина и неотона оказывало положительное воздействие на белково-липидный состав митохондрий печени. При этом эффективность препарата цитофлавина была выше, возможно, за счет способности непосредственно влиять на работу комплексов дыхательной цепи митохондриального аппарата.

ВЫВОДЫ

1. Развитие распространенного гнойного перитонита вызывает негативные изменения белково-липидного состава митохондрий печени при экспериментальном распространенном гнойном перитоните, которые заключаются в снижении содержания холестерина, уровня общих фосфолипидов и увеличении соотношения ОФЛ/ХС.

2. Применение метаболического средства цитофлавина в послеоперационном периоде у животных с распространенным гнойным перитонитом способствует сохранению уровня общих фосфолипидов, восстановлению содержания холестерина и соотношения ОФЛ/ХС, а также увеличению содержания белка в митохондриях печени.

3. Неотон, содержащий фосфокреатин, обладает однопольным с цитофлавином, но менее выражен-

ным действием на белково-липидный состав митохондрий печени.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б011-022).

ЛИТЕРАТУРА

1. Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис и др., *Молекулярная биология клетки*, Мир, Москва (1994).
2. В. В. Афанасьев, *Цитофлавин в интенсивной терапии: пособие для врачей*, Санкт-Петербург (2005).
3. А. А. Болдырев, С. В. Котелевцев, М. Ланио и др., *Введение в биомембранологию: учебное пособие*, МГУ, Москва (1990).
4. Г. А. Грибанов, *Вопр. мед. химии*, № 4, 2 – 10 (1991).
5. М. Кейтс, *Техника липидологии*, Мир, Москва (1975).
6. Г. Ф. Лескова, А. Б. Мичунская, Л. П. Кобозева и др., *Бюл. экпер. биол.*, № 10, 386 – 389 (2003).
7. Т. П. Новгородцева, А. В. Вязова, Н. В. Жукова, *Клин. лаб. диагностика*, № 2, 7-10 (2006).
8. А. А. Покровский, *Биохимические методы исследования*, Медицина, Москва (1969).
9. М. Г. Сачек, С. С. Стебунов, А. Н. Лызикив и др., *Применение креатинфосфата в хирургии*, Витебск (1998).
10. A. J. Chicco, G. C. Sparagna, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **292**(1), C33 – C44 (2007).
11. A. Colbean, G. Nachbaur, P. M. Vignais, *Biochim. Biophys. Acta*, **249**, 462 – 492a (1971).
12. E. D. Crouser, et al., *Crit. Care Med.*, **30**(2), 276 – 284 (2002).
13. A. C. Gornall, C. J. Bardawill, M. M. David, *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 – 766 (1949).
14. D. Johnson, H. Lardy, *Methods Enzymol.*, **10**, 94 – 96 (1967).
15. R. Krämer, *Biochim. Biophys. Acta*, **693**(2), 296 – 304 (1982).
16. J. S. Modica-Napolitano, P. F. Renshaw, *Biological Psychiatry*, **55**(3), 273 – 277 (2004).
17. J. Montero, M. Montserrat, A. Colell, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**(1 – 2), 1217 – 1224 (2010).
18. G. Paradies, *Cell Calcium*, **45**(6), 643 – 650 (2009).
19. D. Schubert, K. Boss, *FEBS lett.*, **150**(1), 4 – 8 (1982).
20. P. Stenvinkel, I. Holmberg, O. Heimbürger, et al., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **13**(10), 2594 – 2600 (1998).
21. A. Svanborg, L. Svennerholm, *Acta med. Scand.*, **169**, 43 – 46 (1961).
22. P. L. Yeagle, *Biochim. Biophys. Acta*, **822**(3 – 4), 267 – 287 (1985).

Поступила 26.07.11

CORRECTION OF PROTEIN-LIPID COMPOSITION IN LIVER MITOCHONDRIA DURING EXPERIMENTAL WIDESPREAD PURULENT PERITONITIS

V. A. Kosinets¹, S. S. Osokchuk², and N. N. Yarotskaya²

¹ General Surgery Department, Sechenov Moscow State Medical Academy, ul. Yauzskaya 11, Moscow, 109240, Russia

² Central Research Laboratory, Vitebsk State Medical University, prosp. Frunze 27, Vitebsk, 210602, Belarus Republic

Experiments performed in a group of 55 chinchilla rabbits showed that the development of widespread purulent peritonitis is accompanied by the expressed changes of protein-lipid structure of liver mitochondria. A comparative analysis of the application of metabolic preparations citoflavin and neoton for the purpose of eliminating pathological deviations in the structure of liver mitochondria has been carried out. The application of citoflavin more effectively prevents decrease in total phospholipids and cholesterol in mitochondrial membranes. In combination with stimulation of an increase in the amount of protein, this points to high protective properties of this preparation which allow the functional potential of liver mitochondria to be retained under conditions of experimental widespread purulent peritonitis.

Key words: Widespread purulent peritonitis, citoflavin, neoton, liver, mitochondria, phospholipids, cholesterol