

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ЦИТОХРОМА С ПРИ ТРАВМАТИЧЕСКОМ ТОКСИКОЗЕ

И. В. Зарубина, П. Д. Шабанов¹

В экспериментах на крысах показано, что травматический токсикоз сопровождается нарушениями экскреторной и детоксикационной функции печени, снижением ее энергетического потенциала. Системное введение крысам цитохрома С сразу после декомпрессии приводит к увеличению в печени содержания эндогенного цитохрома С, восстановлению пула адениннуклеотидов, нормализации элиминации бромсульфалеина из крови, уменьшению содержания токсичных метаболитов в крови животных. Полученные данные свидетельствуют о гепатопротекторных свойствах цитохрома С при развитии травматического токсикоза.

Ключевые слова: травматический токсикоз, печень, цитохром С, метаболизм, АТФ, АДФ, АМФ, мочевины, креатинин

ВВЕДЕНИЕ

В структуре боевых травм и массового травматизма мирного времени в чрезвычайных ситуациях травматический токсикоз, или краш-синдром, развивающийся вследствие длительного раздавливания мягких тканей обломками разрушенных оборонительных сооружений, обвалами грунта и горных пород, занимает видное место [3, 12]. Травматический токсикоз сопровождается в первую очередь функциональными и метаболическими нарушениями печени — центрального органа в обменных процессах, что соответствует раннему периоду течения травматической болезни. Дисфункция печени при обширных повреждениях мышц и последующем миоллизе обусловлена расстройствами системной гемодинамики и органного кровотока, ишемией печени и повреждением ее структур токсическими продуктами аутолиза травмированных тканей. Симптомы, свидетельствующие о функциональных нарушениях печени, обычно появляются у пострадавших на 5–7-е сутки и характеризуются желтушным окрашиванием склер, мягкого неба и кожи, повышением содержания билирубина в крови, угнетением детоксикационной способности печени. Изменение метаболической активности печени влечет расстройство ее белковообразующей, пигментной, экскреторной и других функций, что имеет существенное значение для патогенеза травматического токсикоза [8].

Первостепенная роль печени в энергетическом балансе организма, ее высокая чувствительность к гипоксии определяет пути фармакологической коррекции печеночной дисфункции при травматическом токсикозе. Предпочтение следует отдать антигипоксантами метаболического типа действия [6, 9]. Среди энергодающих антигипоксантами перспективны средства с не-

тканеспецифичным и несистемным действием, нормализующие функции дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования в митохондриях. К ним относятся препараты прямого энергизирующего действия, в том числе субстраты и активаторы ферментов компенсаторных метаболических путей, связанных с циклом Кребса. При нарушении переноса электронов на участке цитохромов b — c, связанном с лабильностью мембран, положительный эффект оказывает экзогенный цитохром С [1]. При травматическом токсикозе с увеличением проницаемости мембран гепатоцитов возрастает способность цитохрома С проникать в клетку, реконструировать поврежденную дыхательную цепь, увеличивая интенсивность окислительного фосфорилирования.

Цель работы заключалась в изучении гепатопротекторного действия цитохрома С при экспериментальном травматическом токсикозе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 97 ненаркотизированных крысах самцах Вистар массой 170–190 г, полученных из питомника Рапполово РАМН (Ленинградская область). Исследование одобрено локальным комитетом по этике при Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова. Травматический токсикоз моделировали 4-часовым сдавливанием мягких тканей задних конечностей в специальных тисках площадью 5 см² с желобообразным вырезом для предупреждения перелома бедренной кости, сила давления 80 кг/см² [2]. Цитохром С (ООО “Самсон-мед”, Санкт-Петербург) вводили внутривентриально сразу после декомпрессии в дозе 10 мг/кг массы тела. Контролем служили иммобилизованные животные, которые получали эквивалентный объем физиологического раствора. Материал для исследования забирали спустя 12 ч после травмы.

О гепатопротекторном действии цитохрома С при травматическом токсикозе судили по скорости выведения из сосудистого русла бромсульфалеина (БСФ) [7].

¹ Кафедра фармакологии (зав. — проф. П. Д. Шабанов) Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова МО РФ, 194044, Санкт-Петербург, ул. акад. Лебедева, 6.
E-mail: pdshabanov@mail.ru

Таблица 1. Влияние цитохрома С на содержание бромсульфалеина в крови крыс (мкмоль/100 мл) при травматическом токсикозе ($M \pm m$, $n = 10 - 15$)

Время наблюдения, мин	Группы крыс			
	интактные	иммобилизация	травма	травма + цитохром С
1	156 ± 11	170 ± 12	0**	128 ± 12***
2	174 ± 7	185 ± 8*	45 ± 11**	141 ± 14***
4	137 ± 6	155 ± 7*	108 ± 11**	127 ± 13***
8	82 ± 5	97 ± 5*	129 ± 10**	98 ± 11***
12	47 ± 6	58 ± 7*	120 ± 7**	71 ± 13***
16	20 ± 5	29 ± 7	95 ± 11**	25 ± 14***
32	2 ± 2	5 ± 2	58 ± 7**	6 ± 4***

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: * $p < 0,05$ в сравнении с интактными животными, ** $p < 0,05$ — в сравнении с иммобилизацией, *** $p < 0,05$ — в сравнении с травмой.

Ретенцию (задержку) БСФ в крови оценивали по формуле:

$$\text{Ретенция (\%)} = C_8 \cdot 100 / C_2,$$

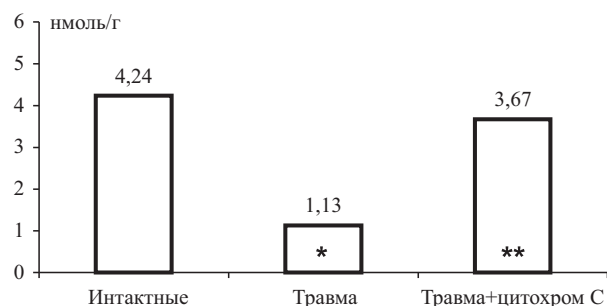
где C_2 — концентрация БСФ в крови через 2 мин после введения БСФ; C_8 — концентрация БСФ в крови через 8 мин после введения БСФ.

Определяли содержание мочевины, мочевой кислоты, креатинина и калия в крови с помощью стандартных биохимических наборов. О биоэнергетических процессах судили по уровню адениннуклеотидного пула в печени и величине энергетического заряда системы адениннуклеотидов [11]. Свободные адениннуклеотиды в печени определяли тонкослойной хроматографией, разделяя их в системе диоксан — изопропанол — аммиак — вода, с последующей прямой флуориметрией пластин в сканирующем устройстве спектрофлуориметра MPF-4 (“Hitachi”, Япония) [4]. В качестве “свидетелей” использовали хроматографически чистые аденозин-5-моно-, ди- и трифосфаты фирмы “Sigma” (США). Спектрофотометрически определяли содержание эндогенного цитохрома С в печени [5].

Выборка составляла 10 – 15 животных. Результаты обрабатывали статистически с использованием стандартного пакета программ Statistika for Windows по общеизвестным методам вариационной статистики с оценкой значимости показателей ($M \pm m$) и различий

Таблица 2. Влияние цитохрома С на содержание мочевины, мочевой кислоты, креатинина и калия в крови крыс при травматическом токсикозе ($M \pm m$, $n = 10 - 15$)

Показатель	Группы крыс			
	интактные	иммобилизация	травма	травма + цитохром С
Мочевина, ммоль/л	7,1 ± 6,0	8,2 ± 3,5	21,8 ± 11,0**	13,1 ± 11,2***
Мочевая кислота, мг/100 мл	3,2 ± 0,5	4,1 ± 0,6	15,2 ± 1,2**	8,2 ± 1,6***
Креатинин, мкмоль/л	57,21 ± 12	64,2 ± 13	182,3 ± 13**	110,3 ± 14***
Калий, ммоль/л	4,2 ± 0,8	5,3 ± 0,6	18,2 ± 1,3**	9,1 ± 1,3***



Изменение содержания цитохрома С в печени крыс при травматическом токсикозе. * $p < 0,05$ в сравнении с интактными животными, ** $p < 0,05$ — в сравнении с травмой.

рассматриваемых выборок по t -критерию Стьюдента. Различия в сравниваемых группах считали достоверными при уровне значимости 95 % ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Среди функциональных исследований печени проба нагрузкой БСФ оказывается положительной даже при относительно незначительном ее токсическом повреждении. Бромсульфалеиновый тест свидетельствует лишь о нарушении экскреторной функции печени, а не о причинах, его вызывающих, и не о характере изменений печеночной ткани. При поражении печени экскреция БСФ в желчь нарушается раньше, чем способность клеток печени к поглощению БСФ.

При травматическом токсикозе наблюдали замедление равномерного распределения красителя в крови по сравнению с группой иммобилизованных животных (контроль). Равномерное распределение красителя в крови продолжалось в течение 8 мин, затем концентрация БСФ снижалась, но через 32 мин после введения красителя в крови травмированных животных определяли высокую концентрацию БСФ — 58 мкмоль/100 мл, ретенция БСФ составляла 287 %. Задержка БСФ в крови крыс свидетельствует об изменении выделения его через желчные ходы и нарушении экскреторной функции печени при тяжелой компрессионной травме. Введение животным сразу после декомпрессии цитохрома С приводило к восстановлению характера элиминации БСФ из крови крыс через 12 ч после травмы (табл. 1).

Максимум содержания красителя определяли на 2-й мин, затем его содержание плавно снижалось и на

Таблица 3. Влияние цитохрома С на содержание адениловых нуклеотидов в печени крыс при травматическом токсикозе ($M \pm m$, $n = 10 - 15$)

Группы животных	АТФ, мкмоль/г	АДФ, мкмоль/г	АМФ, мкмоль/г	Энергетический заряд адениловой системы
Интактные	3,28 ± 0,12	0,52 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,859 ± 0,007
Иммобилизация	2,27 ± 0,11*	0,62 ± 0,08*	0,59 ± 0,07*	0,739 ± 0,007*
Травма	1,57 ± 0,12**	1,00 ± 0,07**	0,87 ± 0,09**	0,585 ± 0,007**
Травма + цитохром С	2,22 ± 0,08***	0,59 ± 0,06***	0,49 ± 0,05***	0,712 ± 0,007***

32-й мин наблюдений определяли лишь незначительное содержание БСФ. Ретенция БСФ в крови крыс на фоне действия цитохрома С составляла 69 %, что в 2 раза меньше, чем у нелеченных животных. Таким образом, на фоне введения цитохрома С равномерное распределение БСФ и его удаление из крови животных отражает активную экскрецию красителя гепатоцитами и свидетельствует о восстановлении экскреторной функции печени.

Травматический токсикоз сопровождался увеличением содержания мочевины в 3 раза в крови животных (табл. 2). Наряду с этим в крови травмированных животных через 12 ч после декомпрессии увеличивалось содержание мочевой кислоты в 3,8 раза, креатинина в 3 раза, калия в 4 раза ($p < 0,05$). Эти данные свидетельствуют и о нарушении функции почек и развитии эндотоксемии при травматическом токсикозе. Введение цитохрома С приводило к достоверному снижению уровня мочевины на 40 % и мочевой кислоты на 46 %, содержания креатинина на 39 %, калия на 50 % ($p < 0,05$).

Тяжелая компрессионная травма вызывает нарушение кровообращения в печени вплоть до анемизации, что определяет характер и направление ее метаболизма. Неполющенность системы окислительного фосфорилирования, интенсификация катаболических и снижение анаболических реакций приводит к субстратному и энергетическому истощению [6, 9]. Наблюдаемое нами прогрессивное снижение макроэргических фосфатов в печени при травматическом токсикозе свидетельствует о нарушении митохондриальной выработки АТФ и ингибировании гликолитического пути освобождения энергии. Через 12 ч после декомпрессии содержание АТФ в печени и энергетический заряд адениннуклеотидов были ниже на 31 % и 21 % соответственно, а уровень АДФ и АМФ выше на 61 % и 47 % в сравнении с контрольными иммобилизованными животными (табл. 3). Введение животным сразу после декомпрессии цитохрома С приводило к восстановлению пула адениннуклеотидов в печени животных. Спустя 12 ч после травмы содержание АТФ в печени крыс увеличивалось на 41 %, энергетический заряд — на 22 %, содержание АДФ и АМФ снижалось на 59 % и 44 % соответственно ($p < 0,05$).

Известно, что при травматическом токсикозе нарушается проницаемость митохондриальных мембран, что способствует выходу из митохондрий эндогенного

цитохрома С, угнетению дыхания и окислительного фосфорилирования. Подтверждением тому служат полученные нами данные о снижении содержания цитохрома С в печени крыс при травматическом токсикозе (рисунок). Введение животным цитохрома С достоверно увеличивало его эндогенный пул в печени. Ранее считалось, что экзогенный цитохром С не способен проникать в клетку в силу относительно большой молекулярной массы, равной 13 кДа [1]. Однако показано, что при токсическом поражении печени введение цитохрома С повышает интенсивность дыхания гепатоцитов и степень его сопряженности с фосфорилированием [10]. Следовательно, можно предполагать, что восстановление в печени компонентов адениловой системы и величины их энергетического заряда при парентеральном введении крысам цитохрома С обусловлено его проникновением в печень и взаимодействием с ее ультраструктурами, в первую очередь, с митохондриями.

ВЫВОДЫ

1. Травматический токсикоз через 12 ч после тяжелой компрессионной травмы сопровождается нарушениями экскреторной и детоксикационной функций печени, что проявляется замедлением экскреции бромсульфалеина в крови, увеличением в крови содержания мочевины, мочевой кислоты, креатинина и калия. Угнетаются биоэнергетические процессы в печени, регистрируемые по уменьшению содержания эндогенного цитохрома С, изменению адениннуклеотидного пула и снижению энергетического заряда.

2. Системное введение травмированным животным цитохрома С (10 мг/кг) приводит к увеличению в печени содержания эндогенного цитохрома С, восстановлению энергетического потенциала, нормализации элиминации бромсульфалеина из крови, уменьшению содержания токсичных метаболитов в крови животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. И. Ващенко, К. П. Хансон, П. Д. Шабанов, *Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии*, 1, 30 – 41 (2005).
2. В. К. Кулагин, *Патологическая физиология травмы и шока*, Медицина, Ленинград (1978), сс. 1 – 296.
3. В. Н. Ельский, *Взрывная шахтная травма. Экспериментальный анализ проблемы*, Донецк (2002), сс. 1 – 172.
4. И. В. Зарубина, Б. И. Криворучко, *Укр. биохим. журн.*, 69(4), 437 – 439 (1982).

5. И. В. Зарубина, Б. И. Криворучко, *Вопр. мед. химии*, **1**, 34 – 36 (1986).
6. И. В. Зарубина, П. Д. Шабанов, *Молекулярная фармакология антигипоксантов*, Н-Л, Санкт-Петербург (2004), сс. 1 – 368.
7. Л. И. Израйлет, В. Н. Соломинский, Т. Н. Шибяева и др., *Гиг. и сан.*, **3**, 59 – 61 (1976).
8. *Организация, обследование и контроль лечения при травматическом токсикозе: Метод. рекомендации*, Москва (1991), сс. 1 – 24.
9. П. Д. Шабанов, И. В. Зарубина, В. Е. Новиков, В. Н. Цыган, *Метаболические протекторы гипоксии*, Информ-Навигатор, Санкт-Петербург (2010), сс. 1 – 912.
10. С. Е. Манойлов, Ю. С. Манойлов, *Физико-химические основы функционирования надмолекулярных структур клетки*, Москва (1974), сс. 29 – 30.
11. D. Atkinson, *Biochemistry*, **7**(10), 4030 – 4034 (1968).
12. E. G. L. Bywaters, *Brit. Med. J.*, **301**, 1412 – 1415 (1990).

Поступила 17.11.10

HEPATOPROTECTIVE PROPERTIES OF CYTOCHROME C WITH RESPECT TO TRAUMATIC TOXICOSIS

I. V. Zarubina and P. D. Shabanov

Pharmacology Department, St. Petersburg State Military Medical Academy, ul. Lebedeva 6,
St. Petersburg, 194044, Russia
*e-mail: pdshabanov@mail.ru

Experiments on rats showed that traumatic toxicosis (crush syndrome) was accompanied by disorders of both excretion and detoxication functions of the liver and a decrease in the energy potential of the liver. Systemic administration of cytochrome C (10 mg/kg) immediately after trauma and decompression increased the level of endogenous cytochrome C, recovered the pool of adenine nucleotides, normalized bromsulfaleine excretion from the blood, and decreased the content of toxic metabolites in the blood. The obtained experimental data show that cytochrome C possesses high hepatoprotective properties with respect to the development of traumatic toxicosis.

Key words: Traumatic toxicosis, liver, cytochrome C, metabolism, ATP, ADP, AMP, urea, creatinine