

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

ВЛИЯНИЕ РЕАМБЕРИНА НА ЛИПИДНЫЙ СПЕКТР МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РАСПРОСТРАНЕННОМ ГНОЙНОМ ПЕРИТОНИТЕ

В. А. Косинец, С. С. Осочук, Н. Н. Яроцкая¹

Изучено состояние белково-липидного спектра митохондрий печени при экспериментальном распространенном гнойном перитоните. Установлено, что реамберин оказывает положительное воздействие на белково-липидный спектр митохондрий печени при распространенном гнойном перитоните: снижает содержание в спектре фосфолипидов митохондрий лизофосфатидов, увеличивает уровень полиглицерофосфатидов и сфингомиелина.

Ключевые слова: распространенный гнойный перитонит, реамберин, янтарная кислота, печень, митохондрии, фосфолипиды, холестерол

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время значительное внимание уделяется изучению митохондрий — клеточных ультраструктур, широкий спектр функций которых варьирует от энергообеспечения клетки до апоптоза [5, 12].

Ранее нами проведены исследования влияния метаболитического средства реамберин на функциональную активность митохондрий мышечной оболочки тонкой кишки с целью устранения энтеральной недостаточности при экспериментальном распространенном гнойном перитоните [3]. Установлено, что препарат способствует эффективному восстановлению нарушений функциональной активности митохондрий и перистальтики тонкой кишки при распространенном гнойном перитоните. Механизм его действия связан с поддержанием работы второго комплекса (сукцинат:хинон оксидоредуктаза) дыхательной цепи митохондрий. Применение реамберина позволило сохранить функциональную активность митохондрий мышечной оболочки тонкой кишки в первые сутки послеоперационного периода, а к пятым суткам достичь показателей интактных животных.

По данным ряда авторов, эффективное функционирование митохондрий связано с интегральной целостностью их структурных компонентов, важнейшими из которых являются липиды [7, 11, 13, 14]. Воздействие повреждающих факторов может приводить как к компенсаторной, так и к патологической модификации липидного соотношения мембран. Энергодефицит в результате нарушения процесса окислительного фосфорилирования и активация на его фоне перекисного окисления липидов, фосфолиполиза вызывают каскад

патологических реакций, повреждение мембранной структуры митохондрий, апоптоз клетки [5, 6, 8].

Развитие распространенного гнойного перитонита сопровождается явлениями выраженной эндогенной интоксикации, гипоксии тканей. Печень является важнейшим деинтоксикационным барьером, метаболитическим и синтезирующим органом. В связи с этим представляется весьма актуальным изучение в условиях распространенного гнойного перитонита состояния липидно-белковой структурной организации митохондрий печени и возможности влияния на нее реамберина, содержащего янтарную кислоту.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 46 кроликах-самцах породы шиншилла, весом 2,6–3 кг. Животные были разделены на следующие группы: интактные ($n = 7$); с распространенным гнойным перитонитом без хирургического лечения ($n = 9$); контрольная группа — хирургическое лечение перитонита без применения в послеоперационном периоде реамберина ($n = 15$); основная группа — хирургическое лечение перитонита с применением в послеоперационном периоде реамберина ($n = 15$).

Реамберин — полиионный раствор для инфузий. Один литр раствора содержит: натрия хлорида 6 г, калия хлорида 0,3 г, магния хлорида 0,12 г, N-(1-дезоксид-D-глюцитол-1-ил)-N-метиламмония натрия сукцината — 15 г [1].

Перитонит моделировали путем внутрибрюшинного 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 веса кролика. Через 6 ч после введения микроорганизмов в основной и контрольной группах животных с целью лечения перитонита и устранения энтеральной недостаточности выполняли лапаротомию, санацию брюшной полости,

¹ Центральная научно-исследовательская лаборатория (зав. — С. С. Осочук) Витебского государственного медицинского университета, Республика Беларусь, Витебск, 210602, пр-т Фрунзе, 27.

декомпрессию тонкой кишки. Животным основной группы в послеоперационном периоде (в течение 5 суток) ежедневно внутривенно капельно вводили реамберин из расчета 85,7 мг янтарной кислоты на 1 кг веса животного, животным контрольной группы — физиологический раствор. Животных с распространенным гнойным перитонитом выводили из эксперимента (летальная доза этаминал-натрия) через 6 ч после заражения (9 животных), основной и контрольной групп — на 1-е, 3-и и 5-е сутки после операции (по 5 животных в исследуемые сроки).

Выделение митохондрий печени выполняли по методу Johnson-Lardy [10]. 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 [2]. Суммарную концентрацию ФЛ митохондрий печени измеряли после минерализации экстракта по реакции с молибдатом аммония и аскорбиновой кислотой [15] по стандарту неорганического фосфата. Индивидуальные ФЛ разделяли методом тонкослойной хроматографии [2]. Результаты выражали в процентах от содержания общих ФЛ. Общие фосфолипиды определяли по количеству неорганического фосфата [4]. Белок определяли биуретовым методом [9].

Статистическую обработку данных проводили с использованием электронных пакетов анализа Statistica 6.0 и Excel. Использованы методы описательной статистики, t-критерий Стьюдента (уровень достоверности отличий средних значений $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У животных с 6-часовым перитонитом отмечен рост процентного содержания лизофосфатидов (ЛФХ) ($p = 0,02$) сфингомиелина (СФХ) ($p > 0,05$) и снижение уровня полиглицерофосфатидов ($p > 0,05$) в мембранах митохондрий печени (табл. 1).

Было достоверно снижено содержание холестерина, ХС ($p = 0,003$) и общих фосфолипидов (ОФЛ)

($p = 0,015$), при этом соотношение ОФЛ/ХС увеличилось ($p = 0,012$), содержание белка осталось неизменным при закономерном увеличении соотношений белок/ХС и белок/ОФЛ ($p = 0,005$ и $p = 0,015$ соответственно) (табл. 2).

На 1-е сутки послеоперационного периода изменения исследуемых параметров были идентичны таковым у животных с 6-часовым перитонитом. Процентное содержание лизофосфатидов по отношению к норме увеличилось с $3,62 \pm 1,17$ до $6,31 \pm 1,01$ ($p = 0,02$), сфингомиелина — с $7,22 \pm 0,64$ до $9,48 \pm 1,66$ ($p = 0,04$), полиглицерофосфатидов (ПГФ) снизилось с $9,74 \pm 1,76$ до $7,15 \pm 1,17$ ($p = 0,04$). В динамике содержания фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭА) статистически значимых изменений выявлено не было.

На 3-и сутки послеоперационного периода в контрольной группе отмечалась нормализация отношений ОФЛ/ХС и белок/ОФЛ. Вместе с тем количество ХС и ОФЛ оставалось сниженным ($p = 0,02$ и $p = 0,04$ соответственно), по сравнению с интактными животными. Вместе с тем их содержание по сравнению с животными с 6-часовым перитонитом увеличилось (статистически значимое увеличение уровня холестерина, $p = 0,002$). Отношение белок/ХС оставалось неизменным по сравнению с предыдущим сроком исследований и достоверно увеличенным по сравнению с группой 6-часового перитонита ($p = 0,04$).

На 5-е сутки послеоперационного периода увеличилось содержание белка митохондрий по сравнению с группой 6-часового перитонита ($p = 0,03$). Остальные параметры практически не отличались от таковых у животных с предыдущим сроком исследования.

Использование реамберина на 1-е сутки после операционного вмешательства препятствовало развитию характерных для перитонита сдвигов в белково-липидном спектре митохондрий печени.

Исследование фосфолипидного спектра митохондрий продемонстрировало достоверное и более интенсивное по сравнению с контрольной группой увеличе-

Таблица 1. Спектр фосфолипидов мембран митохондрий печени при экспериментальном распространенном гнойном перитоните

Показатель	Норма ($n = 7$)	6-часовой перитонит ($n = 9$)	Контрольная группа ($n = 5$), сутки			Основная группа "реамберин" ($n = 5$), сутки		
			1-е	3-и	5-е	1-е	3-и	5-е
Лизофосфатиды	$3,62 \pm 1,17$	$6,44 \pm 1,28$ $p_1 = 0,02$	$6,31 \pm 1,01$ $p_1 = 0,01$	$4,2 \pm 0,38$	$3,88 \pm 0,22$	$4,93 \pm 0,63$	$3,86 \pm 0,51$	$3,27 \pm 0,46$ $p_3 = 0,04$
Сфингомиелин	$7,22 \pm 0,64$	$8,73 \pm 2,56$	$9,48 \pm 1,66$ $p_1 = 0,04$	$8,75 \pm 0,67$	$8,23 \pm 0,43$	$11,15 \pm 1,42$ $p_1 = 0,03$	$11,04 \pm 1,82$	$9,73 \pm 0,83$ $p_3 = 0,02$
Фосфатидилхолин	$43,78 \pm 4,47$	$41,98 \pm 1,93$	$41,07 \pm 3,37$	$43,34 \pm 2,41$	$42,95 \pm 0,99$	$38,34 \pm 4,51$	$37,33 \pm 4,69$	$40,94 \pm 5,40$
Фосфатидилэтаноламин	$35,88 \pm 7,05$	$34,23 \pm 4,64$	$35,99 \pm 2,42$	$35,82 \pm 2,59$	$35,57 \pm 1,86$	$35,5 \pm 1,51$	$35,88 \pm 5,42$	$33,34 \pm 5,43$
Полиглицерофосфатиды	$9,74 \pm 1,76$	$8,12 \pm 1,48$	$7,15 \pm 1,17$ $p_1 = 0,04$	$7,89 \pm 0,65$	$10,12 \pm 1,06$	$10,75 \pm 0,36$ $p_3 = 0,004$	$10,58 \pm 1,45$ $p_3 = 0,04$	$12,09 \pm 0,34$ $p_3 = 0,028$

Примечание. Здесь и в табл. 2 различия статистически значимы по сравнению:

ние процентного содержания сфингомиелина ($p = 0,05$), отмечалась тенденция к снижению процентного содержания фосфатидилэтаноламина по сравнению с интактными животными. Статистически значимое увеличение процентного содержания ПГФ ($p = 0,004$), по сравнению с контрольной группой, учитывая высокую значимость ПГФ, в том числе и КЛ (кардиолипин), для функционирования дыхательной цепи митохондрий, свидетельствовало об эффективном действии реамберина на липидно-белковый спектр митохондрий.

Исследованные параметры белково-липидного состава не отличались от таковых у интактных животных. Содержание ОФЛ было достоверно выше, а отношение белок/ОФЛ ниже, чем у животных контрольной группы ($p = 0,04$). Достоверное снижение содержания ХС и, как следствие, увеличение отношения белок/ХС ($p = 0,004$ и $p = 0,04$ соответственно), по сравнению с нормой было выражено в значительно меньшей степени, чем в контрольной группе.

На 3-и сутки послеоперационного периода в основной группе отмечен рост содержания ХС по сравнению с предыдущим сроком исследований. Исследование фосфолипидного спектра показало тенденцию к недостоверному снижению процентного содержания ЛФХ ($p > 0,05$) и сохранению статистически достоверно более высокого уровня полиглицерофосфатидов ($p = 0,04$).

На 5-е сутки применение реамберина, как и в предыдущие сроки исследований, содержания ХС было достоверно ниже уровня интактных животных

($p = 0,023$). При этом содержание белка достоверно увеличилось, что вызвало увеличение отношения белок/ХС ($p = 0,002$ и $p = 0,059$ соответственно). Выявленные изменения сопровождались достоверным увеличением процентного содержания ПГФ ($p = 0,028$). Сравнение с контрольной группой продемонстрировало достоверно более высокое содержание ОФЛ и белка ($p = 0,036$ и $p = 0,04$ соответственно), а также более низкое, не отличающееся от нормы, отношение белок/ОФЛ ($p = 0,035$).

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о возможности применения метаболического препарата реамберин с целью протективно-стабилизационного воздействия на структурную композицию митохондрий при острых воспалительных заболеваниях органов брюшной полости.

ВЫВОДЫ

1. Развитие 6-часового экспериментального гнойного перитонита сопровождается дисбалансом липидного спектра митохондриальных мембран печени.

2. Изолированное хирургическое лечение распространенного гнойного перитонита является недостаточным для предотвращения прогрессирования нарушений белково-липидного спектра мембран митохондрий.

3. Реамберин способствует восстановлению содержания сфингомиелина, глицеро- и лизофосфатидов, а также общих фосфолипидов в печеночных митохондриальных мембранах.

Таблица 2. Состояние белково-липидного состава мембран митохондрий печени при экспериментальном распространенном гнойном перитоните

Группа	Время исследования	Холестерин	Общие фосфолипиды	ОФЛ/холестерин	Белок/холестерин	Белок	Белок/ОФЛ
Норма, $n = 7$		$15,54 \pm 3,39$	$26,57 \pm 4,09$	$2,56 \pm 0,61$	$0,069 \pm 0,020$	$3,57 \pm 1,24$	$0,038 \pm 0,0059$
6-часовой перитонит, $n = 9$	Через 6 часов после заражения	$5,03 \pm 2,32$ $p_1 = 0,003$	$16,57 \pm 2,80$ $p_1 = 0,015$	$4,49 \pm 0,74$ $p_1 = 0,012$	$0,23 \pm 0,07$ $p_1 = 0,005$	$5,3 \pm 1,47$	$0,062 \pm 0,011$ $p_1 = 0,015$
Контрольная группа	1 сутки после операции, $n = 5$	$4,47 \pm 1,36$ $p_1 = 0,0007$	$17,32 \pm 5,47$ $p_1 = 0,026$	$3,24 \pm 0,62$ $p_2 = 0,04$	$0,152 \pm 0,044$ $p_1 = 0,009$	$4,43 \pm 1,18$	$0,078 \pm 0,027$ $p_1 = 0,03$
	3 суток после операции, $n = 5$	$9,91 \pm 0,85$ $p_1 = 0,02$ $p_3 = 0,002$	$20,63 \pm 3,82$ $p_1 = 0,047$	$2,98 \pm 0,41$	$0,16 \pm 0,06$ $p_1 = 0,04$	$4,22 \pm 0,24$	$0,043 \pm 0,007$
	5 суток после операции, $n = 5$	$8,43 \pm 0,68$ $p_1 = 0,002$	$20,12 \pm 3,77$	$2,72 \pm 0,57$	$0,119 \pm 0,009$ $p_1 = 0,002$	$5,9 \pm 0,53$ $p_1 = 0,03$	$0,053 \pm 0,01$ $p_1 = 0,049$
Основная группа "реамберин"	1 сутки после операции, $n = 5$	$8,11 \pm 1,86$ $p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,026$	$25,63 \pm 4,61$ $p_2 = 0,03$ $p_3 = 0,04$	$2,65 \pm 0,58$ $p_2 = 0,007$	$0,121 \pm 0,027$ $p_1 = 0,022$ $p_2 = 0,028$	$4,7 \pm 1,13$	$0,040 \pm 0,007$ $p_2 = 0,024$ $p_3 = 0,04$
	3 суток после операции, $n = 5$	$10,82 \pm 1,40$ $p_1 = 0,024$	$24,34 \pm 4,20$	$2,62 \pm 0,39$	$0,119 \pm 0,069$	$4,27 \pm 0,50$	$0,0423 \pm 0,008$
	5 суток после операции, $n = 5$	$9,87 \pm 2,53$ $p_1 = 0,023$	$26,58 \pm 3,69$ $p_3 = 0,036$	$2,63 \pm 0,87$	$0,106 \pm 0,027$	$6,7 \pm 0,32$ $p_1 = 0,002$ $p_3 = 0,04$	$0,038 \pm 0,006$ $p_3 = 0,035$

ЛИТЕРАТУРА

1. Инструкция по применению Реамберин 1,5 % для инфузий, Р№ 99 / 363 / 2 от 8.07.1999.
2. М. Кейтс, *Техника липидологии*, Мир, Москва (1975).
3. В. А. Косинец, *Новости хирургии*, № 4, 8 – 15 (2007).
4. А. А. Покровский, *Биохимические методы исследования*, Медицина, Москва (1969).
5. D. Brealey, et al., *Lancet*, **360**(9328), 219 – 223 (2002).
6. A. Boveris, S. Alvarez, and A. Navarro, *Free Radic. Biol. Med.*, **33**(9), 1186 – 1193 (2002).
7. A. J. Chicco and G. C. Sparagna, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **292**(1), C33 – C44 (2007).
8. E. D. Crouser, et al., *Crit. Care Med*, **30**(2), 276 – 284 (2002).
9. A. C. Gornall, C. J. Bardawill, and M. M. David, *J. Biol. Chem.*, **177**(2), 751 – 766 (1949).
10. D. Johnson and H. Lardy, *Methods Enzymol.*, **10**, 94 – 96 (1967).
11. R. Krämer, *Biochim. Biophys. Acta*, **693**(2), 296 – 304 (1982).
12. R. J. Levy, *Shock*, **28**(1), 24 – 28 (2007).
13. E. Mileykovskaya, M. Zhang, and W. Dowhan, *Biochemistry (Mosc)*, **70**(2), 154 – 158 (2005).
14. J. S. Modica-Napolitano and P. F. Renshaw, *Biological Psychiatry*, **55**(3), 273 – 277 (2004).
15. A. Svanborg and L. Svennerholm, *Acta med. Scand*, **169**, 43 – 46 (1961).

Поступила 21.09.09

EFFECT OF REAMBERIN ON THE LIPID SPECTRUM OF LIVER MITOCHONDRIA UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL WIDESPREAD PURULENT PERITONITIS**V. A. Kosinets, S. S. Osochuk, and N. N. Yarotskaya**

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

Lipid spectrum of liver mitochondria has been studied in a group of 46 Chinchilla rabbits with experimental widespread purulent peritonitis. It is established that the drug reamberin that contains succinic acid produces a positive effect on the protein spectrum of liver mitochondria under these conditions, which is manifested by a decrease in the content of lysophosphatidylcholine and increases the levels of polyglycerophosphatides and sphingomyelin.

Key words: Widespread purulent peritonitis, reamberin, amber acid, liver, mitochondria, phospholipids, cholesterol.