

И. А. Криворучко,
В. И. Жуков, Ю.В. Иванова,
М.С. Повеличенко,
А.С. Моисеенко

*Харьковский национальный
медицинский университет
МЗ Украины,*

*ГУ «Институт общей и
неотложной хирургии
НАМИ Украины»*

© Коллектив авторов

КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ИШЕМИИ- РЕПЕРФУЗИИ ТОНКОЙ КИШКИ У КРЫС

Резюме. В эксперименте на белых крысах—самцах линии Вистар массой 200-280 г, у которых моделировали 30-минутную ишемию/реперфузию дистального отдела тонкой кишки, исследовали состояние монооксигеназной системы микросом эндоплазматического ретикулула гепатоцитов. Полученные данные свидетельствуют о снижении всех изучаемых параметров микросомального окисления в ранние сроки исследования (72 час) на фоне роста интенсивности перекисного окисления липидов, что свидетельствует о нарушении функции детоксикации печени. Внутривенное введение церулоплазмينا и карнитина до моделирования ишемии-реперфузии тонкой кишки защищают цитохромы P-450 и B5 от окислительного повреждения, поддерживают активное функционирование цепи электронного транспорта, способствуя улучшению энергообеспечения клеток за счет снижения скорости перекисного окисления липидов и изменения скорости эндогенного дыхания.

Ключевые слова: крысы, ишемия/реперфузия тонкой кишки, микросомальное окисление печени, исследование, церулоплазмин, карнитин, влияние.

Введение

Среди ферментов, участвующих в метаболизме различных токсинов в организме животных и человека, гидроксигирующий комплекс микросом печени занимает особое место в общем процессе детоксикации. Вместе с тем, выполняя функцию поддержания внутреннего гомеостаза и защищая живые системы от токсического воздействия различных факторов, гидроксигирующая система эндоплазматического ретикулула подвержена влиянию как эндо- так и экзогенных веществ, нарушая ее активность.

Основным компонентом микросомальной монооксигеназной системы (МОС) является цитохром P450, который обладает рядом уникальных свойств, определяющих функционирование всей системы. Во-первых, это способность катализировать реакции окисления самых различных по химической структуре соединений. Наряду с этим, ферменты семейства цитохрома P450 важны в оксидативном, пероксидазном и редукционном метаболизме множества эндогенных веществ, таких как стероиды, желчные кислоты, жирные кислоты, простагландины, лейкотриены, биогенные амины и др. Во-вторых, при попадании в организм чужеродных соединений наблюдается явление индукции МОС, заключающееся в увеличении содержания цитохрома P450 в печеночных клетках и повышении активности ряда ферментативных реакций. В-третьих,

цитохром P450 представлен большим числом различающихся изоформ, индуцируемых теми или иными соединениями.

С.И. Голиковым с соавт. [1] были установлены прямые и тесные корреляционные зависимости между цитохромом P450 и B5. Они могут образовывать сложные гемопротейдные комплексы, в результате чего происходит стабилизация цитохрома P450 в каталитически активном конформационном состоянии, которое обеспечивает повышение скорости катализируемых им реакций [4].

Синдром эндотоксемии сопутствует разнообразным заболеваниям человека и, несмотря на интенсивную разработку, многие вопросы патогенеза нарушений функций органов и систем организма при этом синдроме остаются недостаточно выясненными. Тяжесть течения многих заболеваний и их исход в конечном итоге определяется особенностями вторичных неспецифических метаболических расстройств, степенью дестабилизации клеточных мембран, а также возможностями реактивации структурных и ферментных белков в условиях гипоксии.

Поэтому, с точки зрения коррекции нарушений гомеостаза организма, особый интерес вызывают естественные факторы, в том числе, вещества группы «реактантов острой фазы», способные воздействовать на ранних этапах воспалительного ответа. Одним из перспективных представителей этой группы

является полифункциональный белок церулоплазмин, существующий в виде лекарственной формы [2, 7], в том числе — в сочетании с другими препаратами.

Цель эксперимента

Исследовать состояние митохондриальной системы гепатоцитов до и после предварительного введения церулоплазмينا и карнитина хлорида при синдроме ишемии/реперфузии тонкой кишки у крыс.

Материалы и методы исследований

Эксперимент проведен на 80 белых крысах-самцах линии Вистар массой 200–280 г. Содержание животных, уход и методы экспериментальной работы осуществлялись в соответствии с Международными принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.).

Все животные были распределены на 5 групп. Первая — контрольная группа 1 ($n=16$), которым проводили стимулирующую операцию (лапаротомию и релапаротомию (РЛ)); вторая — контрольная группа 2 ($n=16$), у которых моделировали 30-минутный синдром и/р тонкой кишки; третья — А группа животных с предварительным (за 30 мин) введением церулоплазмينا ($n=16$); четвертая — группа животных с предварительным введением карнитина хлорида ($n=16$); пятая — группа животных с предварительным введением церулоплазмينا и карнитина хлорида ($n=16$). Выделяли митохондриальную фракцию печени методом дифференциального центрифугирования и изучали общий пул цитохромов P450 и B5, а также скорость эндогенного дыхания и перекисного окисления липидов. Церулоплазмин вводился дозе 0,5 г/100 г массы тела, карнитин в дозе 50 мг/100 г массы тела внутривенно за 30 минут до моделирования 30-минутной ишемии дистального отдела тонкой кишки. Терапевтический эффект препаратов изучали в динамике: исходные данные и данные, полученные спустя 24 часа, 72 часа и 5 суток после реперфузии тонкой кишки и декапитации животных в исследуемые сроки исследования для исключения влияния наркоза и операционной травмы на изучаемые показатели.

Крыс оперировали в асептических условиях под наркозом тиопентал—натрием (15 мг/100 г массы тела внутримышечно). Моделирование синдрома и/р осуществлялось путем наложения турникета на брыжейку тонкой кишки, пережимая сосуды, кровоснабжающие дистальную половину тонкой кишки, в течение 30 минут.

Полученные данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента; количественную связь признаков оценивали с ис-

пользованием линейной регрессии и корреляции. Различия сравниваемых показателей считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Сравнение активности изучаемых показателей, характеризующих состояние митохондриальной системы гепатоцитов первой группы животных, показало отсутствие достоверных изменений в динамике исследования. При реперфузии в первые 72 часа эксперимента в митохондриальной фракции печени крыс отмечали снижение содержания общего пула цитохромов P450 (соответственно на 2,8; 15,8 и 16,6 %), B5 (соответственно на 1,2; 4,6 и 1,32 %) с их повышением к 5-м суткам соответственно на 1,56 и 1,76 %, а также снижалась активность эндогенного дыхания (соответственно на 7,6; 13,5 и 4,2 %) и возрастала на 5 суткам эксперимента в среднем на 11 % по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (рис. 1, 2, 3). Подобные нарушения отмечались на фоне роста интенсивности перекисного окисления липидов в среднем на 213; 191,8; 266 и 322,9 % (рис. 4) по сравнению с уровнем изучаемых показателей в контрольной группе животных ($p < 0,05$).

Полученные нами результаты исследования состояния монооксигеназной цепи митохондриального ретикула гепатоцитов свидетельствуют о снижении всех изучаемых параметров митохондриального окисления в ранние сроки синдрома и/р тонкой кишки на фоне роста интенсивности перекисного окисления липидов, что свидетельствует о нарушении детоксикационной функции печени. При этом к 5-суткам эксперимента отмечалось повышение изучаемых показателей, что указывало на напряжение монооксигеназной электрон-транспортной цепи системы митохондриального окисления.

Хорошо известно, что функции печени страдают в условиях эндотоксемии [3], сопровождающейся усиленным образованием NO в печеночных клетках в результате индукции NO-синтазы провоспалительными медиаторами % ФНО, IL-1 и др. [5]. NO в этих условиях оказывает защитное действие на ткань печени, поскольку ингибиторы NO-синтазы усиливают повреждение печени при эндотоксемии. С другой стороны, NO образует комплекс с гемовым железом цитохрома P450 и инактивирует этот ключевой фермент монооксигеназной системы, объясняя резкое уменьшение содержания цитохрома P450 в печени в условиях экспериментальной эндотоксемии [6]. Следовательно, связанный с реперфузией тонкой кишки воспалительный ответ, включающий активацию и дисфункцию лейкоцитов с освобождением и действием провоспалительных цитокинов и кислородных радикалов, вызы-

вает нарушения микросомального окисления печени. А если учесть, что этот вид реакций монооксигеназного пути окисления является защитной реакцией организма для окисления различных чужеродных веществ, которые переходят в безвредные или становятся более растворимыми в воде и легко выводятся из организма, поиск методов коррекции нарушений монооксигеназной и редуктазной цепи микросом эндоплазматического ретикула гепатоцитов при заболеваниях, сопровождающихся явлениями эндотоксикоза, является актуальной проблемой.

Проведенные нами экспериментальные исследования предварительного внутрибрюшного введения церулоплазмينا с карнитином на общий пул цитохромов P450 и B5 эндоплазматического ретикула в тканях печени крыс показали их способность защищать цитохромы от окисления в условиях реперфузии тонкой кишки (рис. 1-4). Определение количественной связи признаков оценивали с использованием линейной регрессии и корреляции показало, что сочетанное использование церулоплазмينا и карнитина хлорида оказывало положительное влияние на уро-

вень цитохромов P450 и B5 ($r=0,966$, $p=0,034$; $r=0,975$, $p=0,025$), а также на скорость перекисного окисления липидов ($r = - 0,99$, $p=0,008$) и скорость эндогенного дыхания ($r=0,96$, $p=0,0390$) при сравнении с группой контроля 2. При этом изолированное использование церулоплазмينا ($r=0,96$, $p=0,037$) и карнитина хлорида ($r=0,99$, $p=0,01$) также оказывало положительное влияние на скорость эндогенного дыхания.

Известно, что церулоплазмин является белком плазмы крови, выполняющий в организме ряд важных биологических функций: повышает стабильность клеточных мембран, участвует в иммунологических реакциях (в формировании защитных сил организма), ионном обмене, оказывает антиоксидантное (препятствующее перекисному окислению липидов клеточных мембран) действие, тормозит перекисное окисление липидов, стимулирует гемопоэз. Фермент церулоплазмин является универсальным внеклеточным «гасителем» свободных радикалов, выполняя в организме ряд важных биологических функций: повышает стабильность клеточных мембран, участвует в иммунологических реакциях

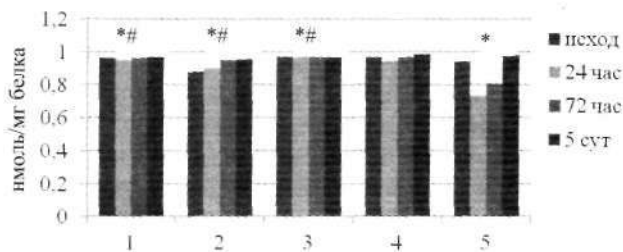


Рис. 1. Динамика изменений общего пула цитохрома P450 при предварительном введении церулоплазмينا (1), карнитина (2) и их совместном использовании (3) по сравнению с контролем 1 (4) и контролем 2 (5).
Примечание: * – достоверно с контролем 1; # – достоверно с контролем 2, $p<0,05$.

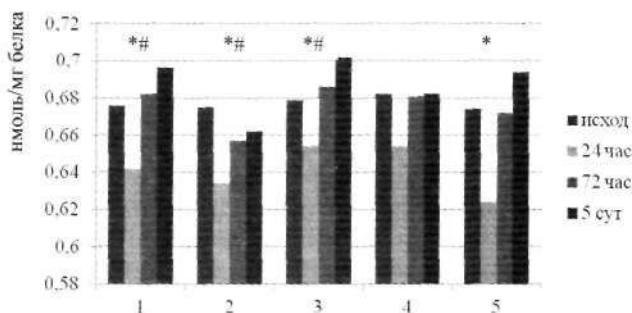


Рис. 2. Динамика изменений общего пула цитохрома b5 при предварительном введении церулоплазмينا (1), карнитина (2) и их совместном использовании (3) по сравнению с контролем 1 (4) и контролем 2 (5).
Примечание: * – достоверно с контролем 1; # – достоверно с контролем 2, $p<0,05$.

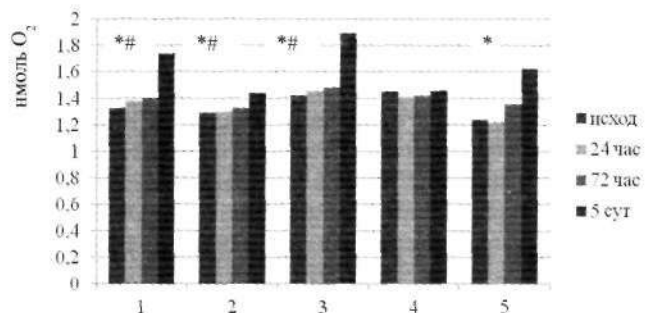


Рис. 3. Динамика изменений скорости эндогенного дыхания при предварительном введении церулоплазмينا (1), карнитина (2) и их совместном использовании (3) по сравнению с контролем 1 и контролем 2 (5).
Примечание: * – достоверно с контролем 1; # – достоверно с контролем 2, $p<0,05$.

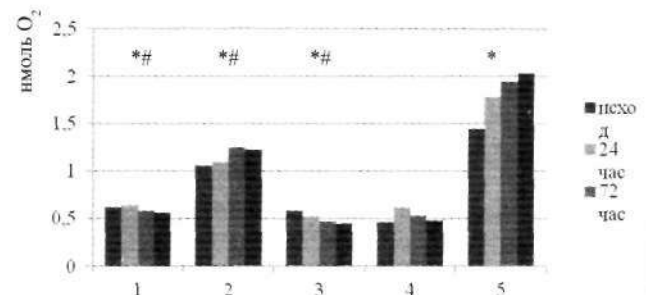


Рис. 4. Динамика изменений скорости перекисного окисления липидов при предварительном введении церулоплазмينا (1), карнитина (2) и их совместного использования (3) по сравнению с ложнооперированными (4) и крысами после 30-мин. ишемии (5).
Примечание: * – достоверно с контролем 1; # – достоверно с контролем 2, $p<0,05$.

(в формировании защитных сил организма), ионном обмене, стимулирует гемопоэз (кровообразование). Церулоплазмин имеет супероксиддисмутазную активность: восстанавливает в крови супероксидные радикалы до кислорода и воды и этим защищает от повреждения липидные структуры мембран. Одной из основных функций церулоплазмينا является нейтрализация свободных радикалов, которые освобождаются вовне макрофагами и нейтрофилами во время фагоцитоза, а также при интенсификации свободнорадикального окисления в очагах воспаления. Он окисляет разные субстраты: серотонин, катехоламины, полиамины, полифенолы, превращает двухвалентное железо в трехвалентное. Церулоплазмин переносит медь из печени к органам и тканям, где она функционирует в виде цитохром-С-редуктазы и супероксиддисмутаза. Фермент является фактором естественной защиты организма при воспалительных, аллергических процессах, стрессовых состояниях, повреждениях тканей, в частности, при инфаркте миокарда, ишемии.

Карнитина хлорид является ко-фактором метаболических процессов, обеспечивающих поддержание активности коэнзима А, снижает основной обмен, замедляет распад белковых и углеводных молекул, способствует проникновению через мембраны митохондрий и расщеплению длинноцепочных жирных кислот с образованием ацетил-КоА (необходим для обеспечения активности пируваткарбоксилазы в процессе глюконеогенеза, образования кетонных тел, синтеза холина и его эфиров, окислительного фосфорилирования и образования АТФ).

Таким образом, как показали проведенные экспериментальные нами исследования, использование церулоплазмينا в сочетании с карнитином, защищая цитохромы Р-450 и Ь5 от окислительного повреждения, поддерживает активное функционирование цепи электронного транспорта, способствуя улучшению энергообеспечения клеток за счет снижения скорости перекисного окисления липидов и изменения скорости эндогенного дыхания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голиков С. И. Общие механизмы токсического действия / С.И. Голиков, И.В. Саноцкий, Л.А. Тиунов. — Л.: Медицина. — 1986. — 276 с.
2. Кривохижина, Л.В. Гематологические эффекты церулоплазмينا / Л. В. Кривохижина, Е. В. Климова, Е. Н. Ермолаева. // Тезисы докладов II Российского конгресса по патофизиологии. — М. — 2000. — С. 93-94.
3. Самсонов В. П. Дренирование правого и грудного лимфатических протоков, методы эфферентной терапии и эндолимфатического введения антибиотиков в комплексном лечении гнойно-деструктивных заболеваний легких : дисс. ... д-ра мед. наук / Самсонов В. П. — Благовещенск. — 1990. — 296 с.
4. Уваров В. Ю. Влияние цитохрома Ь5 на функциональную активность и конформационное состояние цитохрома Р450 / В. Ю. Уваров, Г.И. Багшанова, А.И. Арчаков // Биохимия. - 1983. - Вып. 9. - С. 1542-1547.
5. Alexander B. The role of nitric oxide in hepatic metabolism/ B. Alexander//Nutrition. - 1998. - Vol. 14, № 4. - P.376-390.
6. Inhibition of cytochrome P450 by nitric oxide / Y. Minamiyama, S. Takemura, S. Imaoka [et al.] // Nippon. Yakurigaku. Zasshi. - 1998. -Vol. 112, - № 1. - P. 33-41.
7. Shimizu M. Clinical results on the use of human ceruloplasmin in aplastic anemia / M. Shimizu // Transfusion. - 1979. - Vol. 19. - № 6. - P. 742-748.