



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  
НАМН 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. Внутривентральное введение церулоплазмина 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 оксидазном, 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 микросомальной 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  $\frac{3}{4}$  контрольная группа 1 (n=16), которым проводили стимулирующую операцию (лапаротомию и релапаротомию (РЛ)); вторая  $\frac{3}{4}$  контрольная группа 2 (n=16), у которых моделировали 30-минутный синдром и/р тонкой кишки; третья  $\frac{3}{4}$  группа животных с предварительным (за 30 мин) введением церулоплазмينا (n=16); четвертая  $\frac{3}{4}$  группа животных с предварительным введением карнитина хлорида (n=16); пятая  $\frac{3}{4}$  группа животных с предварительным введением церулоплазмينا и карнитина хлорида (n=16). Выделяли микросомальную 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, карнитина в дозе 50 мг/100 г массы тела внутривентриально 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 микросомальной системы гепатоцитов первой группы животных, показало отсутствие достоверных изменений в динамике исследования. При реперфузии в первые 72 часа эксперимента в микросомальной 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 микросом эндоплазматического ретикула гепатоцитов свидетельствуют о снижении всех изучаемых параметров микросомального 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 микросомального окисления.

Хорошо известно, что функции печени страдают в условиях эндотоксемии [3], сопровождающейся усиленным образованием NO в печеночных клетках в результате индукции NO-синтетазы провоспалительными медиаторами  $\frac{3}{4}$  ФНО, IL-1 и др. [5]. NO в этих условиях оказывает защитное действие на ткань печени, поскольку ингибиторы NO-синтетазы 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-



ваєт порушення мiкросомального окислення печени. А якщо учесть, що цей вид реакцiй монооксигеназного пути окислення являється захисною реакцiєю органiзму для окислення рiзних чужеродних вiществ, котрiе переходять в безвреднiе или становляться бiльше розвiдимими в водi и легко виводяться из органiзму, пошк методiв коррекцiї порушень монооксигеназної и редуцтазної цeпи мiкросом ендоплазматического ретикулума гепатоцитiв при захворюваннях, супроводжуваних явленнями ендотоксикоза, являється актуальною проблемою.

Проведеннiе нами експериментальнiе дослідження попереднього внутрiбрюшного введення церулоплазмiна с карнитином на общiй пул цитохромiв P450 и b5 ендоплазматического ретикулума в тканинах печени крiв показали их спiвбiсть захищати цитохроми от окислення в умiвях реперфузiї тонкої кишкi (рис. 1-4). Визначення количественної зв'язки ознак оцiнювали с використанням лiнійної регресiї и кореляцiї показало, що спiвбiльне використання церулоплазмiна и карнитина хлорида оказувало позитивне вплив на уро-

вень цитохромiв P450 и b5 ( $r=0,966$ ,  $p=0,034$ ;  $r=0,975$ ,  $p=0,025$ ), а також на шкiрсть перекисного окислення липидiв ( $r = - 0,99$ ,  $p=0,008$ ) и шкiрсть ендogenous дихання ( $r=0,96$ ,  $p=0,0390$ ) при сравненiї с групою контролi 2. При цьому iзолированное використання церулоплазмiна ( $r=0,96$ ,  $p=0,037$ ) и карнитина хлорида ( $r=0,99$ ,  $p=0,01$ ) також оказувало позитивне вплив на шкiрсть ендogenous дихання.

Вiдомо, що церулоплазмiн являється бiлком плазми кровi, виконуючий в органiзми ряд важних бiологических функцiї; підвищує стiбильнiсть мембран, участвує в иммунологических реакцiях (в формированiї захисних сил органiзму), ионном обмiнi, оказує антиоксидантне (препятствующее перекисному окислению липидiв мембран) дiєвiє, тормозит перекисное окисление липидiв, стимулює гемопоєз. Фермент церулоплазмiн являється универсальним вiвклеточным «гасителем» свободних радикалiв, виконуючи в органiзми ряд важних бiологических функцiї: підвищує стiбильнiсть мембран, участвує в иммунологических реакцiях

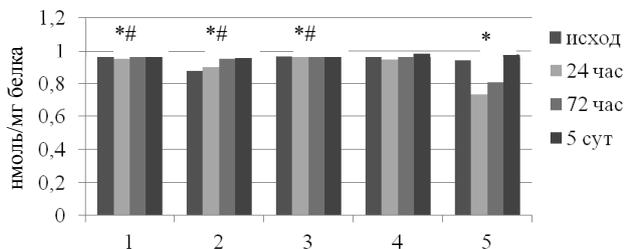


Рис. 1. Динамика изменений общего пула цитохрома P450 при предварительном введении церулоплазмiна (1), карнитина (2) и их совместном использовании (3) по сравнению с контролем 1 (4) и контролем 2 (5). Примечание: \* – достоверно с контролем 1; # – достоверно с контролем 2,  $p<0,05$ .

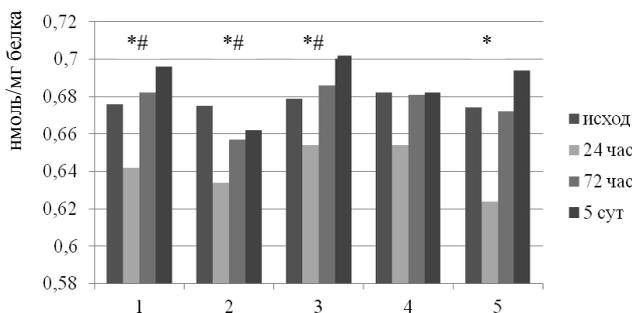


Рис. 2. Динамика изменений общего пула цитохрома b5 при предварительном введении церулоплазмiна (1), карнитина (2) и их совместном использовании (3) по сравнению с контролем 1 (4) и контролем 2 (5). Примечание: \* – достоверно с контролем 1; # – достоверно с контролем 2,  $p<0,05$ .

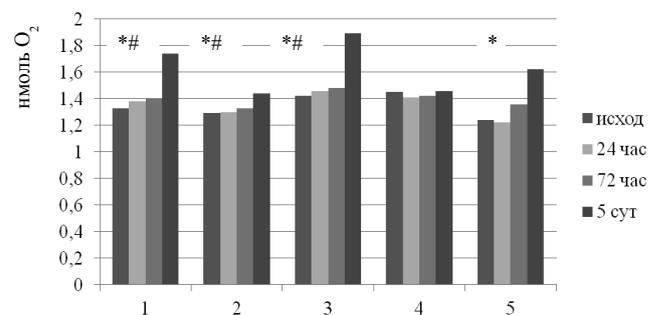


Рис. 3. Динамика изменений скорости эндогенного дыхания при предварительном введении церулоплазмiна (1), карнитина (2) и их совместном использовании (3) по сравнению с контролем 1 и контролем 2 (5). Примечание: \* – достоверно с контролем 1; # – достоверно с контролем 2,  $p<0,05$ .

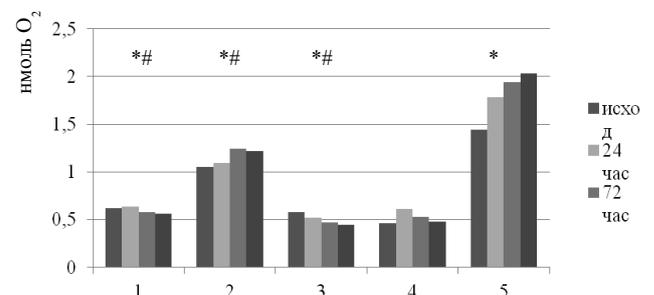


Рис. 4. Динамика изменений скорости перекисного окисления липидiв при предварительном введении церулоплазмiна (1), карнитина (2) и их совместного использования (3) по сравнению с ложнооперированными (4) и крысами после 30-мин. ишемии (5). Примечание: \* – достоверно с контролем 1; # – достоверно с контролем 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 супероксиддисмутазы. Фермент является фактором естественной защиты организма при воспалительных, аллергических процессах, стрессовых состояниях, повреждениях тканей, в частности, при инфаркте миокарда, ишемии.

Карнитина хлорид является 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 b5 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 b5 на функциональную активность и конформационное состояние цитохрома P450 / 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.



КОРЕКЦІЯ ПОРУШЕНЬ  
МІКРОСОМАЛЬНОГО  
ОКИСЛЕННЯ ПЕЧІНКИ ПРИ  
ШЕМІЇ-РЕПЕРFUЗІЇ ТОНКОЇ  
КИШКИ У ЩУРІВ

*I.A. Криворучко,  
В.І. Жуков, Ю.В. Іванова,  
М.С. Повеличенко,  
А.С. Моїсеєнко*

**Резюме.** В експерименті на білих щурах-самцях лінії Вістар вагою 200-280 г, у яких моделювали 30-хвилинну ішемію/реперфузію дистального відділу тонкої кишки, досліджували стан монооксигеназного та редуктазного ланцюгів мікросом ендоплазматичного ретикулу гепатоцитів. Отримані дані свідчать о зниженні всіх показників мікросомального окислення, що досліджувались, в ранні терміни (72 год) на тлі зростання інтенсивності перекисного окислення ліпідів, що свідчить про порушення функції детоксикації печінки. Внутрішньочеревне введення церулоплазміну і карнітину до моделювання ішемії-реперфузії тонкої кишки захищають цитохроми P-450 і b5 від окислювального пошкодження, підтримують активне функціонування ланцюга електронного транспорту, сприяючи поліпшенню енергозабезпечення клітин за рахунок зниження швидкості перекисного окислення ліпідів та зміни швидкості ендogenous дихання.

**Ключові слова:** *щури, ішемія/реперфузія тонкої кишки, мікросомальне окислення печінки, дослідження, церулоплазмін, карнітин, вплив.*

CORRECTION OF LIVER  
MICROSOMAL OXIDATION  
DURING ISCHEMIA-  
REPERFUSION IN THE RAT  
SMALL INTESTINE

*I.A. Kryvoruchko,  
V.I. Zhukov, Ju.V.Ivanova,  
M.S. Povelichenko,  
A.S. Moiseenko*

**Summary.** In experiment on white rats-males of Vistar line in weight of 200-280gr. simulated a 30-minute ischemia/reperfusion of distal part of small intestine, investigated a condition of monooxygenase and reductase chains of microsome of hepatocytes endoplasmic reticulum. The obtained data testify about decrease of all studied parameters microsomal oxidations in early terms investigation (72 hour), against the intensity growth of lipid peroxidation, that testifies about malfunction of detoxication liver functions. Preliminary abdominal introduction of ceruloplasmin and carnitine to modeling ischemia-reperfusion of the small intestine protect cytochromes P-450 and b5 from oxidative damage, support the active functioning of the electron transport chain, contributing to improved energy cells by reducing the rate of lipid peroxidation and changes in endogenous respiration rate.

**Key words:** *rats, ischemia, reperfusion of small intestine, liver microsomal oxidations, investigation, ceruloplasmin, carnitine, influence.*