

Н.Н. ЯРОЦКАЯ, И.В. САМСОНОВА, В.А. КОСИНЕЦ

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ЦИТОХРОМА С ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РАСПРОСТРАНЕННОМ ГНОЙНОМ ПЕРИТОНИТЕ

УО «Витебский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь

Цель. Изучить влияние метаболитических препаратов «Цитофлавин» и «Неотон» на экспрессию маркера апоптоза цитохрома с в печени кроликов при экспериментальном распространенном гнойном перитоните.

Материалы и методы. Проведен иммуногистохимический анализ уровня интенсивности экспрессии цитохрома с в срезах печени кроликов (n=55) при экспериментальном распространенном гнойном перитоните. Материал окрашивали с использованием антител к цитохрому с ("Sigma", USA). Анализ серийных микрофотографий выполнен с использованием цифровой аналитической системы (микроскоп Leica DM 2000, программа Leica Application Suite 3.6.0). Морфометрическую оценку проводили с использованием программы ImageJ 1.45s, в рамках которой количественно оценивали интенсивность окрашивания препаратов.

Результаты. Иммуногистохимическая оценка срезов печени показала его присутствие в цитоплазме гепатоцитов как при гнойном перитоните, так и в образцах интактной группы в виде от светло- до темно-коричневого окрашивания различной интенсивности. При этом на ранних сроках инициации перитонита уровень экспрессии цитохрома с как сигнального маркера апоптоза значительно снижается, что связано с повреждением мембранных структур гепатоцитов, что сопровождалось модификацией активности большинства внутриклеточных ферментов, угнетением антиоксидантной функции печени, нарушением синтетических процессов, разобщением тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, снижением синтеза АТФ, развитием гипоксии. Препарат «Цитофлавин», содержащий янтарную кислоту, по сравнению с содержащим креатинфосфат препаратом «Неотон» к 5-м суткам послеоперационного периода приводит к постепенному восстановлению уровня цитохрома с, что, возможно, обусловлено положительным влиянием препарата на энергетические процессы в клетке, тем самым повышая их устойчивость к интоксикации.

Заключение. Экспрессия цитохрома с при экспериментальном распространенном гнойном перитоните служит ранним маркером повреждения печени. Снижение ее интенсивности связано с массивной гибелью гепатоцитов вследствие выраженной интоксикации.

Ключевые слова: экспериментальный распространенный гнойный перитонит, печень, цитохром с, Неотон, Цитофлавин

Objectives. To study the influence of metabolic preparations "Citoflavin" and "Neoton" on cytochrome c expression of apoptotic markers in the rabbit liver at experimental generalized purulent peritonitis.

Methods. The immunohistochemical analysis of cytochrome c expression intensity in the liver specimens of rabbits (n=55) was carried out at experimental generalized purulent peritonitis. Tissue samples were stained using antibodies to cytochrome c ("Sigma", USA). The analysis of serial microphotos was performed by the digital analytical system (microscope Leica DM 2000, Leica Application Suite 3.6.0 program.). All morphometric parameters were manually measured using ImageJ 1.45S software with histological quantification assessed intensity of staining agents.

Results. Liver sections revealed its presence in cytoplasm of hepatocytes both at purulent peritonitis and in samples of intact group as light to dark brown staining of different intensity. At the same time in the early stages of peritonitis initiation the level of cytochrome c expression as a apoptotic signal significantly decreases due to the damage of membrane structures of hepatocytes, accompanied by the modification activity of many intracellular enzymes, inhibition of antitoxic liver function, violation of synthetic processes, dissociation in respiring tissues and oxidative phosphorylation, reduction in ATP synthesis, development of hypoxia. The preparation "Citoflavin" (containing amber acid) in comparison to the preparation "Neoton" (containing creatinephosphate) on the 5th day of the postoperative period leads to gradual restoration of the cytochrome c level. It may be a result of a positive influence of the preparation on energy processes in a cell, thus increasing resistance to intoxication.

Conclusion. The cytochrome c expression is a marker for the early diagnosis at experimental generalized purulent peritonitis. Reduction of its intensity is correlated with the massive hepatocyte apoptosis due to the severe intoxication.

Keywords: experimental generalized purulent peritonitis, cytochrom c, Citoflavin, Neoton, amber acid, creatinephosphate, resistance to intoxication

Novosti Khirurgii. 2016 Jan-Feb; Vol 24 (1): 62-69

The Influence of Metabolic Preparations on Intensity of
Cytochrome c Expression at Experimental Generalized Purulent Peritonitis

N.N. Yarotskaya, I.V. Samsonava, V.A. Kosinets

Введение

Лечение распространенного гнойного перитонита является актуальной проблемой хирургии, что обусловлено высокой летальностью при данной патологии. Во многом это связано с развитием шокового состояния организма и вовлечением в процесс многих органов и систем, что усугубляет тяжелое состояние пациента в остром периоде с развитием синдрома взаимного отягощения повреждений [1].

Одной из основных причин неблагоприятного исхода при перитоните является эндогенная интоксикация микробными токсинами и продуктами клеточной биодegradации. Повышение проницаемости слизистой кишечника на фоне развивающегося перитонита сопровождается поступлением бактерий и эндотоксинов в порталный и системный кровоток [2].

Повреждение эндотоксинами печени, воздействие на гепатоциты биологически активных веществ приводит к нарушению в них метаболических процессов, нарастанию процессов некробиоза и некроза и развитию функциональной недостаточности органа, в том числе снижению его детоксикационной функции [3].

Как известно, в процессе метаболизма митохондрии гепатоцитов постоянно продуцируют некоторое количество супероксид-иона (O_{2+}) и перекиси водорода (H_2O_2) [4]. В норме содержание их в клетке жестко контролируется широким спектром биохимических инструментов антиоксидантной защиты. Токсическое действие высокореактивных метаболитов на митохондриальные мембраны, повреждение механизмов антиоксидантной защиты печеночных клеток повышает проницаемость мембран для электролитов и низкомолекулярных соединений, что ведет к нарушению механизмов окислительного фосфорилирования, внутриклеточному накоплению Ca^{++} , истощению факторов роста и резервов АТФ до такого уровня, который несовместим с жизнью. В результате «энергетическая катастрофа» печеночных клеток приводит к их гибели путем некроза [5].

Как и во всех многоклеточных системах, гомеостаз печени зависит от критического баланса между клеточным ростом и гибелью клеток. Последнее, в основном, осуществляется путем запрограммированного режима гибели путем апоптоза [6].

S. Etewa et al. в своих исследованиях показали, что в зоне воспаления образование очагов некроза способствует синтезу больших количеств провоспалительных цитокинов, в частности, ФНО α и ФНО β , которые, как известно, способны запускать механизм апоптоза [7].

Различают два принципиально различных механизма индукции апоптоза: внешний (через специальные «рецепторы смерти», расположенные на поверхности клетки) и внутренний. Внешний характерен для неповрежденных клеток, внутренний — для патологически измененных клеток и осуществляется двумя путями: ядерным, включающимся в результате повреждения ДНК, и митохондриальным, который запускается в результате повреждения мембран митохондрий [8].

Цитохром с представляет собой многофункциональный белок, локализованный во внутренней мембране митохондрий, принимающий непосредственное участие в жизни и смерти клетки. Являясь неотъемлемой частью процесса производства энергии в клетке, он участвует в передаче электронов по электронно-транспортной цепи митохондрий. Повреждение митохондриальной мембраны приводит к выходу цитохрома с в цитоплазму клетки и способствует образованию белкового комплекса, содержащего прокаспазу 9 и апоптотический протеаза-активирующий фактор-1 (Араф-1). Сформированная апоптосома активирует эффекторные каспазы 3, 7 и 6, которые в конечном итоге приводят клетку к гибели путем апоптоза [9].

Цитохром с электростатически и гидрофобно связан с внутренней мембраной митохондрии преимущественно через кардиолипин, который при непосредственном взаимодействии с цитохромом с превращает белок в пероксидазу. Снижение уровня кардиолипина приводит к высвобождению цитохрома с в цитоплазму и запуску программы апоптоза [10]. Последнюю реакцию вызывают активные формы кислорода, которые неизбежно образуются при перекисном окислении ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав мембран эндоплазматического ретикула и митохондрий, что приводит к активации субстанций, запускающих апоптотический каскад реакций в клетке [11].

В условиях интоксикации и гипоксии работа дыхательной цепи митохондрий и синтез макроэргических соединений являются определяющими факторами функционирования и жизни клеток. Учитывая то, что цитохром с является важным маркером апоптоза клеток, представляется актуальным изучение влияния на его экспрессию метаболических средств — прямых или опосредованных участников процесса окислительного фосфорилирования.

Цель. Изучить влияние метаболических препаратов «Цитофлавин» и «Неотон» на экспрессию маркера апоптоза цитохрома с в печени кроликов при экспериментальном распространенном гнойном перитоните.

Материал и методы

Эксперимент проведен на 55 кроликах-самцах породы шиншилла, массой 2600-3000 г. Животные были распределены на следующие группы: I – интактные (n=5); II – через 6-ть часов после заражения и без хирургического лечения (n=5); III – контрольная, хирургическое лечение перитонита (n=15); IV – хирургическое лечение перитонита с применением в послеоперационном периоде препарата «Цитофлавин» в течение 5-ти суток (n=15); V – хирургическое лечение перитонита с применением в послеоперационном периоде препарата «Неотон» в течение 5-ти суток (n=15).

Работу с экспериментальными животными проводили согласно рекомендациям Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях от 18.03.1986, Директиве Совета ЕЭС от 24.11.1986, рекомендациям FELASA (1994-1996) и ТКП 125-2008.

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. Количество микробных тел рассчитывали по стандарту мутности McFarland. Через 6 часов после введения микроорганизмов в III-ей, IV-ой и V-ой группах животных с целью лечения перитонита и устранения энтеральной недостаточности выполняли лапаротомию, санацию брюшной полости, декомпрессию тонкой кишки. Животные IV-ой и V-ой групп получали внутривенно капельно препараты «Цитофлавин» (28,6 мг янтарной кислоты на 1 кг массы) и «Неотон» (0,05 г на 1 кг массы) соответственно, животные III-ей группы – эквивалентный объем 0,9%-ного раствора натрия хлорида.

«Цитофлавин» – раствор для инфузий, содержащий янтарную кислоту, никотинамид, рибоксин и рибофлавин. Выбор препарата обусловлен тем, что янтарная кислота является энергетическим субстратом, мощность системы энергопродукции которой в сотни раз превосходит все другие системы энергообразования организма, а также обладает детоксицирующим, антигипоксическим и антиоксидантным свойствами [12].

«Неотон» – метаболическое средство, содержащее креатинфосфат, который образуется в митохондриях и является соединением, обеспечивающим механизм быстрого ресинтеза АТФ [13].

Животных с распространенным гнойным перитонитом II-й группы выводили из экс-

перимента (летальная доза нембутала) через 6 часов после заражения, животных III-ей, IV-ой и V-ой групп – на 1-е, 3-и и 5-е сутки после проведенной операции.

Для гистологического исследования кусочки печени фиксировали в 10%-ом растворе нейтрального формалина в течение 24 часов. После стандартной гистологической проводки и заливки в парафин изготавливали срезы толщиной 3-4 мкм, монтировали на высокоадгезивные предметные стекла (Leica Microsystems Plus Slides). Депарафинирование и иммуногистохимическое исследование проводили по стандартному протоколу в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Leica BOND-MAX.

Окрашивание срезов производили с использованием овечьих моноклональных антител к цитохрому с Anti-Cytochrom C – кат. № C9616 (“Sigma”, USA) в разведении 1:100 при времени экспозиции 60 мин.

Оценку экспрессии цитохрома с в гепатоцитах осуществляли при 400-кратном увеличении в 10 случайно выбранных полях зрения с использованием бинокулярного микроскопа Leica DM 2000 с цифровой камерой и лицензионной программой Leica Application Suite, version 3.6.0. При фотосъемке исключали поля зрения, содержащие дефекты ткани, дефекты окрашивания, а также периферические участки срезов. Морфометрическую оценку проводили с использованием программы ImageJ 1.45s, в рамках которой количественно оценивали интенсивность окрашивания препаратов. Количественные данные по выраженности экспрессии цитохрома с представляли в виде интенсивности экспрессии (ИЭ), которую рассчитывали по формуле:

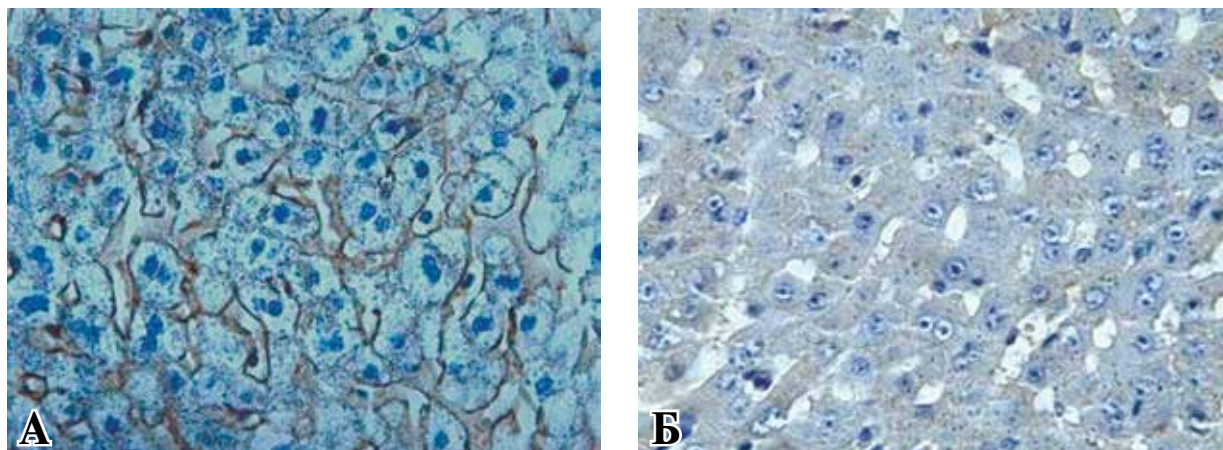
$$ИЭ = \frac{\text{значение экспрессии (в пикселях)}}{\text{общая площадь образца}} \times \frac{\text{площадь экспрессии}}{\text{экспрессии}} \times 100\%$$

где ИЭ – интенсивность экспрессии маркера цитохрома с в ткани печени.

Статистическая обработка результатов проведена с помощью стандартного пакета статистических программ “STATISTICA 10.0” и “MS Excel”. Величины анализируемых показателей в группах представляли в виде медианы (Me), интерквартильного интервала [25%; 75%]. Достоверность межгрупповых значений средних величин оценивали по критерию Манна-Уитни (U) и Уилкоксона (W). Различия принимались за достоверные при p<0,05.

Результаты

Имуногистохимическая оценка срезов печени, окрашенных моноклональными анти-



**Рис. 1. Экспрессия цитохрома с. Окраска anti-Cytochrome с. Ув. ×400.
А – интактная группа; Б – 6-часовой перитонит.**

телами к цитохрому с Anti-Cytochrom C, показала его присутствие в цитоплазме и цитолемме гепатоцитов как при гнойном перитоните, так и в образцах интактной группы в виде коричневого окрашивания различной интенсивности (от светло- до темно-коричневого) (рис. 1 А).

Медиана экспрессии цитохрома с через 6 часов после инициации перитонита составила 0,73 баллов ($p < 0,0001$), в норме – 2,10 (рис. 1 Б). При этом морфометрическая оценка препаратов печени показала наличие значительного количества гепатоцитов с некробиотическими и некротическими изменениями (таблица 1).

На 1-е сутки послеоперационного периода в контрольной группе экспрессия сохранялась на уровне 0,78 баллов (рис. 2 А) и не имела достоверных различий с группой 6-часового перитонита, что сопровождалось стабильно высокими значениями количества гепатоцитов с некробиотическими и некротическими изменениями (таблица 2).

Морфометрическая оценка изменений препаратов на 1-е сутки после операции у животных, получавших препарат, содержащий янтарную кислоту, выявила значительное количество клеток в состоянии некроза. При этом медиана экспрессии цитохрома с составила 0,61 и не имела достоверных отличий от контрольной группы аналогичного периода и группы 6-часового перитонита (рис. 2 Б).

Степень экспрессии цитохрома с у животных, получавших препарат «Неотон», на 1-е сутки после операции составила 1,83, что было достоверно выше таковых значений в группе контроля, в группе 6-часового перитонита и в группе животных, получавших препарат «Цитофлавин» ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$ соответственно) (рис. 2 В). При этом морфометрически выявлено увеличение в 1,5 раза ($p < 0,0001$) количества дистрофически из-

мененных клеток, количество же гепатоцитов с явлениями некроза ($p < 0,0001$) было в 1,5 раза ниже контрольных показателей.

На 3-и сутки после операции в контрольной группе (рис. 3 А) медиана экспрессии цитохрома с составила 1,59 балла, что в 2 раза превышало таковое значение на 1-е сутки послеоперационного периода ($p < 0,0001$), однако не достигало значений интактной группы.

Морфометрическая оценка состояния гепатоцитов в данный период продемонстрировала увеличение более чем в 1,5 раза количества клеток с дистрофическими изменениями ($p < 0,0001$), наряду со снижением в 1,4 раза количества гепатоцитов с некротическими и некробиотическими изменениями в сравнении с 1-ми сутками.

На фоне применения препарата «Цитофлавин», содержащего янтарную кислоту, экспрессия цитохрома с незначительно нарастала по сравнению с 1-ми сутками после операции и составила 0,71 балла (рис. 3 Б). При этом количество гепатоцитов в состоянии некроза в сравнении с контрольной группой снижалось в 1,8 раза ($p < 0,0001$) и нарастало количество гепатоцитов с дистрофическими изменениями.

Медиана экспрессии цитохрома с на фоне применения препарата креатинфосфата «Неотон» на протяжении 3-х суток после операции сохранялась на уровне 1,88 балла и не имела достоверных отличий в сравнении с 1-ми сутками. Однако по сравнению с контрольной группой и группой, получавшей препарат «Цитофлавин», в аналогичный период экспрессия цитохрома с была достоверно выше в 1,2 раза и 2,6 раза соответственно ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$) (рис. 3 В). Количество некротически измененных гепатоцитов снижалось в 1,1 раза и достоверно отличалось от аналогичного показателя контрольной группы ($p < 0,0001$).

Таблица 1

Интенсивность экспрессии цитохрома с в клетках печени в динамике при экспериментальном распространенном гнойном перитоните на фоне применения метаболической коррекции

| Группа | Показатель | Интенсивность экспрессии Cytochrom c | |
|------------------------------|---------------------|--------------------------------------|--|
| Норма (n=5) | Медиана, % | 2,10 | |
| | 25-75 процентиль, % | 1,81-2,37 | |
| 6-ти часовой перитонит (n=5) | Медиана, % | 0,73 p1<0,0001 | |
| | 25-75 процентиль, % | 0,47-1,05 | |
| Контрольная (n=15) | 1-е сутки | Медиана, % | 0,78 p1<0,009; p2=0,384 |
| | | 25-75 процентиль, % | 0,51-1,32 |
| | 3-е сутки | Медиана, % | 1,59 p1=0,842; p3<0,0001 |
| | | 25-75 процентиль, % | 1,29-2,55 |
| | 5-е сутки | Медиана, % | 3,74 p1<0,0001; p3<0,0001 |
| | | 25-75 процентиль, % | 3,11-4,19 |
| Цитофлавин (n=15) | 1-е сутки | Медиана, % | 0,61 p1<0,0006; p2=0,428 p4=0,152; p5<0,0001 |
| | | 25-75 процентиль, % | 0,32-1,06 |
| | 3-е сутки | Медиана, % | 0,71 p1<0,004; p3<0,0002; p4<0,0001; p5<0,0008 |
| | | 25-75 процентиль, % | 0,44-1,34 |
| | 5-е сутки | Медиана, % | 2,53 p1<0,0039; p3<0,0001; p4<0,036; p5<0,0001 |
| | | 25-75 процентиль, % | 1,95-4,08 |
| Неотон (n=15) | 1-е сутки | Медиана, % | 1,83 p1=0,636; p2<0,0001; p4<0,0001 |
| | | 25-75 процентиль, % | 1,33-2,21 |
| | 3-е сутки | Медиана, % | 1,88 p1=0,685; p3<0,028 p4=0,90 |
| | | 25-75 процентиль, % | 1,62-1,92 |
| | 5-е сутки | Медиана, % | 1,12 p1<0,009; p3=0,213; p4<0,0001 |
| | | 25-75 процентиль, % | 0,93-1,60 |

Примечание: p1 – по сравнению с нормой; p2 – по сравнению с группой 6-часового перитонита; p3 – по сравнению с предыдущими сроками аналогичной группы; p4 – по сравнению с контрольной группой аналогичных суток; p5 – по сравнению с препаратом Неотон аналогичных суток

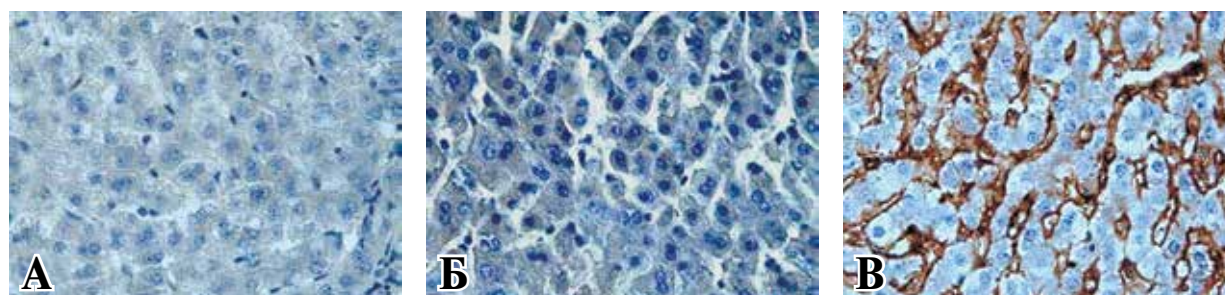


Рис. 2. Экспрессия цитохрома с в гепатоцитах на 1-е сутки. Окраска anti-Cytochrome c, Ув. ×400. А – контрольная группа; Б – на фоне применения «Цитофлавина»; В – на фоне применения «Неотона»

Таблица 2

Дистрофические и некротические изменения гепатоцитов при экспериментальном распространенном гнойном перитоните

| Показатель | II группа (6-часовой перитонит) (n=5) | | III группа (без лечения) (n=15) | | IV группа (с применением Цитофлавина) (n=15) | | V группа (с применением Неотона) (n=15) | |
|--|--|--------------|---------------------------------------|---------------|---|---------------|--|---------------|
| | 1-е сутки | 3-и сутки | 1-е сутки | 3-и сутки | 1-е сутки | 3-и сутки | 1-е сутки | 3-и сутки |
| Количество гепатоцитов в состоянии некроза Медиана, % | 174,00 | 132,50 | 108,00 | 73,50 | 169,00 | 73,50 | 120,00 | 119,00 |
| | | $p1 < 0,03$ | $p2 < 0,001$ | $p2 < 0,008$ | $p3 < 0,003$ | | $p3 < 0,001$ | $p3 < 0,001$ |
| Количество гепатоцитов с мутным набуханием Медиана, % | 39,00 | 30,00 | 44,50 | 66,00 | 36,00 | 66,00 | 53,00 | 51,00 |
| | | $p1 < 0,001$ | $p2 < 0,009$ | $p2 < 0,0001$ | $p3 < 0,001$ | $p3 < 0,0003$ | $p3 < 0,001$ | $p3 < 0,001$ |
| Количество гепатоцитов с гидропической дистрофией Медиана, % | 45,00 | 71,50 | 99,00 | 76,00 | 49,50 | 76,00 | 72,00 | 73,00 |
| | | $p1 < 0,001$ | $p2 < 0,001$ | $p2 < 0,0002$ | $p3 < 0,005$ | $p3 < 0,0007$ | $p3 < 0,001$ | $p3 < 0,0003$ |

Примечание: p1 – по сравнению с группой 6-часового перитонита; p2 – по сравнению с предыдущими сроками аналогичной группы; p3 – по сравнению с контрольной группой аналогичных суток; p4 – по сравнению с препаратом Неотон аналогичных суток

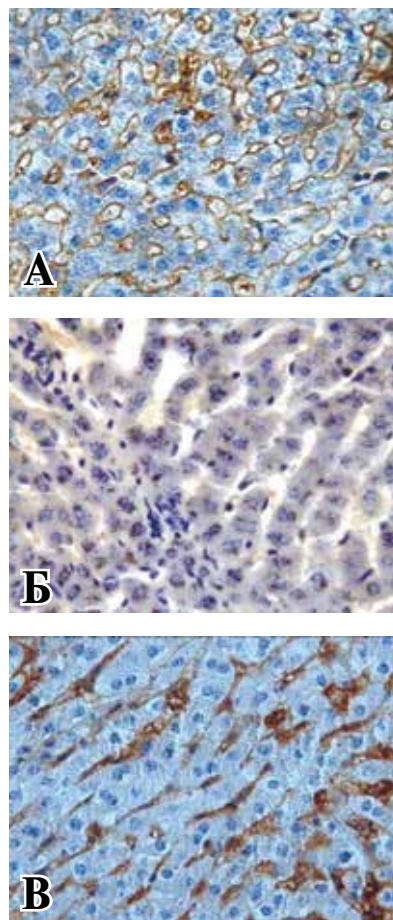


Рис. 3. Экспрессия цитохрома с в гепатоцитах на 3-и сутки. Окраска anti-Cytochrome с. Ув. ×400. А – контрольная группа; Б – на фоне применения «Цитофлавина»; В – на фоне применения «Неотона».

Значение медианы экспрессии цитохрома с на 5-е сутки в контрольной группе (рис. 4 А) показало значительное нарастание до 3,74 баллов и имело достоверно значимые отличия в сравнении с 1-ми и 3-ми сутками ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ соответственно) и в 1,8 раза превышало таковое значение в интактной группе ($p < 0,0001$). Вместе с тем отмечалось уменьшение количества гепатоцитов с явлениями некроза, но сохранение высоких показателей дистрофических изменений в клетках.

В группе животных, получавших препарат, содержащий янтарную кислоту, на 5-е сутки степень экспрессии цитохрома с составила 2,53 балла, достоверно отличалась от контрольной группы ($p < 0,03$) и приближалась к значениям интактной группы (рис. 4 Б). При этом количество некротически измененных гепатоцитов было достоверно значимо ниже (в 2,2 раза) по сравнению с контрольной группой ($p < 0,0001$).

На 5-е сутки послеоперационного периода в группе животных, получавших препарат «Неотон», степень экспрессии цитохрома с снижалась по сравнению с предыдущими сроками и

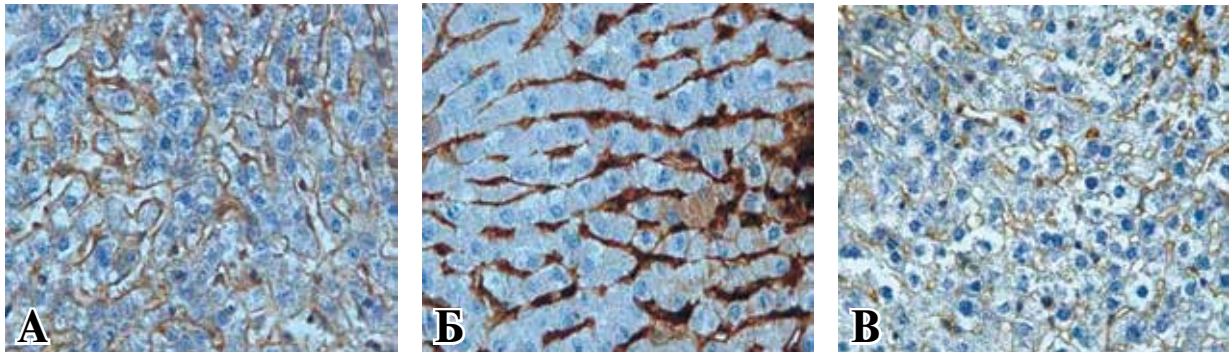


Рис. 4. Экспрессия цитохрома с в гепатоцитах на 5-е сутки. Окраска anti-Cytochrome с. Ув. $\times 400$. А – контрольная группа; В – на фоне применения «Цитофлавина»; Б – на фоне применения «Неотона»

составила 1,12 балла. При этом данный показатель достоверно значимо отличался от такового в контрольной группе ($p < 0,0001$), а также в группе, получавшей препарат «Цитофлавин» ($p < 0,0001$), и у интактных животных ($p < 0,009$) (рис. 4 В). Количество же клеток с явлениями некроза и некробиоза не имело достоверно значимых отличий от контрольной группы.

Обсуждение

Таким образом, проведенное исследование выявило изменения уровня экспрессии цитохрома с как маркера сигнального пути процесса апоптоза в гепатоцитах при экспериментальном распространенном гнойном перитоните. В нормальных условиях гепатоциты постоянно подвергаются обновлению посредством апоптоза, о чем свидетельствует экспрессия цитохрома с, обнаруженная в интактной группе, что согласуется с данными литературы [14].

Известно, что перитонит, осложненный развитием полиорганной недостаточности, вызывает нарушение печеночного гомеостаза из-за дисбаланса между повреждающими и защитными сигналами, который в нормальных физиологических условиях жестко регулируется [15]. Снижение активности экспрессии цитохрома с в печени в эксперименте на ранних этапах инициации перитонита связано, по-видимому, с повреждением мембранных структур гепатоцитов, что сопровождалось модификацией активности большинства внутриклеточных ферментов, угнетением антиоксидантной функции печени, нарушением синтетических процессов, разобщением тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования, снижением синтеза АТФ, развитием гипоксии.

Полученные данные о значительном (в 2 раза) повышении экспрессии цитохрома с в контрольной группе к 5-м суткам послеоперационного периода продемонстрировали гибель гепатоцитов путем апоптоза, что, надо полагать,

является следствием развития структурных изменений на фоне тяжелой бактериальной интоксикации.

Показано, что действие креатинфосфата связано с внутриклеточным транспортом энергии: он может передавать свою фосфатную группу на аденозиндифосфат (АДФ), тем самым восстанавливая его вновь до аденозинтрифосфата (АТФ) [16]. Однако, как видно из результатов исследования, вероятность повреждения гепатоцитов, в целом, и митохондрий, в частности, при экспериментальном перитоните на фоне применения препарата «Неотон» остается достаточно высокой. На это указывает изменение интенсивности экспрессии цитохрома с с ее снижением с 1,83 до 1,12 балла, что может быть обусловлено высоким уровнем процессов некроза.

Если на 1-е сутки послеоперационного периода на фоне применения содержащего янтарную кислоту препарата «Цитофлавин» интенсивность экспрессии цитохрома с была сходной с таковой в контрольной группе, то к 5-м суткам послеоперационного периода значения приближались к значениям в интактной группе. Это может указывать на восстановление метаболических процессов в гепатоцитах, снижение выраженности дистрофических, некробиотических и некротических процессов, восстановление детоксикационной и каталитической функций печени. Возможно, выявленные изменения отражают позитивную реакцию гепатоцитов на проводимую метаболическую терапию препаратом, содержащим янтарную кислоту.

Выводы

1. Распространенный гнойный перитонит сопровождается снижением интенсивности экспрессии маркера апоптоза цитохрома с, что, вероятно, связано с массивным некрозом гепатоцитов вследствие выраженной интоксикации.

2. Возрастание экспрессии цитохрома с к 5-м суткам послеоперационного периода при экспериментальном распространенном гнойном перитоните при отсутствии метаболической поддержки указывает на нарастание процессов апоптоза гепатоцитов на фоне сохраняющихся высоких показателей дистрофических и некротических изменений.

3. Применение препарата креатинфосфата «Неотон» характеризуется снижением экспрессии цитохрома с в динамике, что, возможно, обусловлено преобладанием процессов некробиоза и некроза гепатоцитов над процессами апоптоза при экспериментальном распространенном гнойном перитоните.

4. Использование метаболического препарата «Цитофлавин», содержащего янтарную кислоту, способствует восстановлению уровня цитохрома с в гепатоцитах печени к 5-м суткам послеоперационного периода при экспериментальном распространенном гнойном перитоните, что, вероятно, обусловлено его мембраностабилизирующим действием и положительным влиянием на энергетические процессы в клетке.

Конфликт интересов отсутствует.

Компаний-производители лекарственных средств не поддерживали данное исследование.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савельева ВС, Гельфанда БР, Филимонова МИ, редакторы. Перитонит: практ рук. Москва, РФ: Литтерра; 2006. 208 с.
2. Едранов СС. Апоптоз как фактор организации посттравматического воспаления. *Тихоокеан Мед журн.* 2012;(2):100-104.
3. Власов АП, Циликаина ОВ (Логинава ОВ), Меркушкина ИВ, Захаркин АГ, Тюрина ЕП., Каргаев ВН. Роль молекулярных дестабилизаций в патогенезе эндотоксикоза. *Рос Журн Гастроэнтерологии Гепатологии Колопроктологии.* 2007;XVII(5):124.
4. Bender CE, Fitzgerald P, Tait SW, Llambic F, McStay GP, Tupper DO, et al. Mitochondrial pathway of apoptosis is ancestral in metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Mar 27;109(13): 4904–09. doi: 10.1073/pnas.1120680109.
5. Bixi J, Hsieh CH, Chen J, Choudhry M, Bland K, Chaudry I, et al. Activation of endoplasmic reticulum stress response following trauma-hemorrhage. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Nov;1782(11):621-26. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.08.007.

6. Apoptosis and necrosis: role of excitotoxins, calcium, oxidative stress. Sundaram RS, Gowtham L, Manikandan P, Venugopal V, Kamalakannan D, et al. *Int J Pharm Biomed Res.* 2012 Apr-Jun;3(2):567-75.

7. Samia E, Abd El-Aal NF, Abdel-Rahman SA, Abd El Bary EH, El-Shafei MA. Studies on the role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-) in hepatocytes induced apoptosis in vaccinated, schistosoma mansoni challenged mice. *J Egypt Soc Parasitol.* 2015 Apr;45(1):47-60.

8. Nanji AA, Hiller-Sturmhufer S. Apoptosis and necrosis. *Alcohol Health Res World.* 1997;21(4):325-30.

9. Kulikov AV, Shilov ES, Mufazalov IA, Gogvadze V, Nedospasov SA, Zhivotovsky B. Cytochrome c: the Achilles' heel in apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:1787-1797. doi 10.1007/s00018-011-0895-z.

10. Стоян СА. Апоптоз: современный взгляд на проблему. *Сиб Мед Журн.* 2004;42(1):16-19.

11. Варга ОЮ, Рябков ВА. Апоптоз: понятие, механизмы реализации, значение. *Экология Человека.* 2006;(7):28-32.

12. Якубовский СВ, Анищенко СЛ, Емельянова АА, Чайка ЛЛ. Влияние сукцинатсодержащих препаратов на структурные изменения в печени при остром экспериментальном холецистите. *Арх Патологии.* 2012;(6):28-31.

13. Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids.* 2011 May;40(5):1271-96. doi: 10.1007/s00726-011-0877-3.

14. Бажанова ЕД, Теплый ДЛ. Участие некоторых гепатопротекторов и иммуномодуляторов в регуляции апоптоза гепатоцитов, индуцированного противотуберкулезными препаратами. *Вестн РАМН.* 2013; (8):45-50.

15. Милюков ВЕ, Долгов ЕН, Муршудова ХМ, Нгуен КК, Полунин СВ. Клинические проявления острой печеночной недостаточности при острой тонкокишечной непроходимости. *Журн Анатомии и Гистопатологии.* 2013;2(1):84-91.

16. Cooper R, Naclerio F, Allgrove J, Jimenez A. Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: an update. *J Int Soc Sports Nutr.* 2012; 9: 33. doi: 10.1186/1550-2783-9-33.

Адрес для корреспонденции

210022, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр-т Фрунзе, д. 27, корп. 3,
УО «Витебский государственный
медицинский университет»,
научно-исследовательская лаборатория,
тел. моб.: +375 29 714-18-76,
e-mail: yardip@yandex.ru,
Яроцкая Наталья Николаевна

Сведения об авторах

Яроцкая Н.Н., научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории УО «Витебский государственный медицинский университет».

Самсонова И.В., к.м.н., доцент, заведующая кафедрой патологической анатомии УО «Витебский

государственный медицинский университет».

Косинец В.А., д.м.н., профессор кафедры госпитальной хирургии с курсами урологии и детской хирургии УО «Витебский государственный медицинский университет».

Поступила 24.11.2015 г.