

## КАЧЕСТВЕННЫЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПЕРИТОНИТЕ

*В.А. Трофимов, А.П. Власов, М.М. Миннебаев*

*Кафедра биохимии (зав. — проф. Р.Е. Киселева), кафедра факультетской хирургии (зав. — проф. А.П. Власов) Мордовского государственного университета, кафедра патологической физиологии (зав. — проф. М.М. Миннебаев) Казанского государственного медицинского университета*

Липидный состав биомембран варьирует в пределах, определяемых действующими экзо- и эндогенными факторами [10, 17]. Биохимическим изменениям в обмене липидов отводится важная роль в формировании комплекса адаптационных и (или) защитно-приспособительных реакций [10, 16]. Нарушения липидного обмена могут лежать в основе развития деструктивных процессов в мембранах. Реальные предпосылки для изменения состава тканевых липидов возникают при перитоните. Это обусловлено тем, что спектр модифицирующих факторов при данной патологии значительно расширяется за счет образования в больших количествах медиаторов воспаления, гормонов, токсических продуктов клеточного распада, микробных экзо- и эндотоксинов и т.п. [4, 18]. Поэтому целью настоящего исследования являлось изучение динамики спектра тканевых липидов и их окисленности как факторов патогенеза перитонита.

Исследования были проведены на 40 беспородных собаках, у которых под наркозом вызвали перитонит путем введения в брюшную полость 0,3 г/кг массы тела животного каловой взвеси в 0,9% растворе хлорида натрия. Через сутки в реактивной стадии перитонита интраоперационно производили биопсию печени и кишечника. Контрольная группа была представлена 15 животными.

Липиды экстрагировали по Хиггинсу [15]. Нейтральные липиды разделяли на силикагелевых пластинах (ТОО “Хромтех”) в смеси растворителей гексан/диэтиловый эфир/уксусная кислота (90:10:1 по объему). Фосфолипиды фракционировали в системе растворителей хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода (60:50:1:4) на пластинах (TLC Plates, Sigma-Aldrich) [9]. Количественное определение липидов производили непосредственно на хроматограммах, обработанных 5%-й фосфорномолибденовой кислотой в этаноле с помощью денситометра Model GS-670 (B10-RAD, США) с соответствующим программным обеспечением (Phosphor Analyst/PS Sotware). Для ингибитор-

ного анализа использовали бромфенацилбромид, хлорид лития, хлорпромазин (“Sigma”), а также фенилметансульфонилфторид — PMSF (“Merk”), которые добавляли в среду инкубации и выдерживали ткани при 37°C и продувании воздухом в течение 30—40 минут. Содержание диеновых и триеновых конъюгатов оценивали спектрофотометрическим методом, рассчитывая индексы окисленности  $A_{232}/A_{215}$  и  $A_{275}/A_{215}$ . Уровень малонового диальдегида определяли спектрофотометрическим методом по реакции с тиобарбитуровой кислотой [7], активность супероксиддисмутазы — по способности фермента тормозить аэробное восстановление нитросинего тетразолия до формазана, который имеет максимум поглощения в области 560 нм [5]. Математическую обработку данных производили методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

При перитоните спектр липидов тканей кишечника, печени и плазмы крови подвергался значительным изменениям (табл. 1).

В реактивной стадии заболевания в ткани кишечника, наиболее подверженной морфофункциональным изменениям, происходило, во-первых, повышение содержания свободных жирных кислот (СЖК) и лизоформ фосфолипидов (ФЛ), которые, как известно, обладают мембранодеструктивным действием, нарушают кальциевую проницаемость, инициируют процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) [8]. Во-вторых, отмечено относительное понижение доли холестерина (ХС) и его эфиров (ЭХС) на фоне уменьшения уровня суммарных ФЛ, что также является фактором дестабилизации мембран, а в-третьих, уменьшение доли основных мембранных ФЛ — фосфатидилхолина (ФХ), сфингомиелина (СФМ), кислых фосфатидилинозита (ФИ) и фосфатидилсерина (ФС), динамика содержания которых отражает изменения микровязкости и величины суммарного отрицательного заряда липидного биослоя.

Относительный состав липидов (в %) в тканях кишечника, печени и в плазме крови у собак в норме и при перитоните

Спектр липидов	В ткани		В плазме крови
	кишечника	печени	
ХС	<u>33,27±1,26</u>	<u>28,11±1,87</u>	<u>31,25±0,79</u>
	25,36±1,65***	21,10±1,05***	32,41±1,48
ЭХС	<u>23,85±1,65</u>	<u>14,50±0,88</u>	<u>27,27±0,45</u>
	16,14±1,07***	29,35±1,58***	17,96±0,93***
ДАГ	<u>2,85±0,37</u>	<u>14,00±0,35</u>	—
	5,73±0,64**	8,99±0,61***	—
ТГЛ	<u>2,78±0,44</u>	<u>14,67±0,56</u>	<u>10,38±0,86</u>
	3,75±0,30	7,89±0,54***	15,17±0,99
СЖК	<u>6,10±0,74</u>	<u>4,18±0,30</u>	<u>3,72±0,38</u>
	22,63±1,08***	10,67±0,54***	10,01±0,67***
ФЛ	<u>30,16±1,14</u>	<u>26,67±0,81</u>	<u>29,52±1,27</u>
	26,09±1,46*	22,19±1,46**	24,33±1,27
ФЭА	<u>10,13±0,35</u>	<u>23,46±0,43</u>	<u>8,79±0,18</u>
	23,28±1,33***	29,33±1,24***	10,51±0,62**
ФИ	<u>5,79±0,42</u>	<u>7,66±0,17</u>	—
	3,26±0,21***	10,30±0,91***	—
ФС	<u>6,40±0,32</u>	<u>3,74±0,12</u>	<u>6,38±0,49</u>
	3,87±0,34***	7,96±0,83***	6,10±0,23***
ФХ	<u>47,80±0,39</u>	<u>46,61±0,30</u>	<u>50,59±1,02</u>
	31,30±1,33***	27,91±1,75***	57,16±0,97***
СФМ	<u>26,18±0,29</u>	<u>18,73±0,42</u>	<u>29,19±0,79</u>
	22,60±0,86***	16,50±0,31**	16,53±0,70
ЛФЛ	<u>3,50±0,17</u>	<u>1,67±0,12</u>	<u>5,87±0,27</u>
	15,37±0,91***	8,23±0,78***	9,60±0,62***

Примечание. В числителе — исходные показатели, в знаменателе — показатели при перитоните.

\* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001.

Отмеченные изменения в составе липидов могут нарушить структурно-функциональное состояние клеточных биомембран. В качестве приспособительной компенсаторной реакции, направленной на поддержание структурной целостности и функциональной активности биомембран, по-видимому, можно рассматривать накопление фосфатидилэтаноламина (ФЭА). Его присутствие способно повлиять на жидкостное состояние липидных бислоев и оптимизировать структурно-функциональное состояние биомембран при относительном дефиците других форм липидов. Распад ФХ и уменьшение фонда метаболически активного ФИ на фоне увеличения доли лизофосфатидилхолина (ЛФХ), СЖК, 1,2-диацилглицерина (ДАГ) указывают на преобладание гидролитических процессов, обусловленных активизацией фосфолипаз и запуск липидзависимых сигнальных систем, вероятно, имеющий рецептор-опосредованную природу, поскольку в агонистах, инициирующих их

запуск, во внеклеточной среде недостатка нет. К тому же, как известно, для перитонита характерен синдром эндогенной интоксикации, выступающий причиной нарушения метаболизма [18].

Локальный метаболический сбой, имеющий место в кишечнике при перитоните, вероятно, может приводить к нарушению обмена липидов в печени — органе, обеспечивающем взаимодействие и взаимообусловленность многих биохимических процессов, включающих биосинтез и катаболизм, транспортировку липидов и их встраивание в биомембраны [14]. При перитоните в ткани печени, как это характерно и для ткани кишечника, обнаруживается рост содержания СЖК и лизофосфолипидов (ЛФЛ) — продуктов реакции гидролитического расщепления ФЛ, катализируемых фосфолипазой А<sub>2</sub>, что сочетается с понижением уровня ФХ. Отмечается также уменьшение доли свободного ХС и суммарных ФЛ, триацглицеридов (ТГЛ) и суммарных ФЛ. В спектре

ФЛ обнаруживается рост долей ФЭ и ФС. Несмотря на сходство изменений в спектре липидов, в ткани печени, в отличие от кишечника, возрастают уровни ЭХС, ФИ, ФС и уменьшается доля ДАГ.

Относительно небольшое повышение уровня СЖК может быть связано с усилением этерификации ХС, выполняющего роль демпферного механизма, призванного смягчать негативные последствия бурного накопления продуктов гидролитического расщепления мембранных ФЛ. Количественные сдвиги в спектре ФЛ позволяют с уверенностью утверждать, что в генезе мембранодеструктивных перестроек ключевая роль принадлежит фосфолипазам, высокий уровень функциональной активности которых, по-видимому, является причиной накопления СЖК, лизоформ ФЛ и ДАГ. Вероятно, высокий уровень метаболически-компенсаторных ресурсов обеспечивает липидному компоненту ткани печени относительно низкий уровень патогенетических изменений.

Известно, что при повреждении в печени срабатывает несколько механизмов, обеспечивающих ее быструю регенерацию. Среди них выделяются следующие: 1) мощная антиоксидантная система; 2) способность оставшихся клеток переносить возросшую метаболическую нагрузку; 3) активизация факторов, стимулирующих рост и снижение их активности, ингибирующих рост клеток печени; 4) усиление нейрогенной стимуляции клеток печени [3, 20].

Отмеченный дисбаланс в любом из звеньев сложной биохимической системы обмена липидов может приводить к качественным и количественным изменениям в липидном компоненте крови. Последняя участвует в генерализации патогенетического процесса, поскольку имеет непосредственный контакт с печенью и всеми другими органами и тканевыми структурами. При наличии патогенного очага, тем более вовлечении в процесс печени и накоплении различных токсических веществ экзо- и эндогенного происхождения, липидный спектр плазмы крови и форменных элементов подвержен различным модифицирующим влияниям, оценка выражен-

ности которых позволяет судить о глубине заболевания. Молекулярные основы патогенеза перитонита включают в себя выраженные изменения в липидном спектре плазмы крови. При перитоните на фоне относительно стабильного уровня ХС происходит уменьшение содержания его этерифицированных форм. Известно, что "пропорциональность" плазменных фондов ХС и ЭХС определяется многими факторами, например, зависит от активности фермента фосфатидилхолинхолестеринацилтрансферазы, который катализирует реакцию этерификации с образованием ЭХС и ЛФХ [14]. Последняя реакция является важной в плане регуляции фондов свободного и этерифицированного ХС крови и направленности реакций обмена ХС (катаболизма или анаболизма). Фактические данные указывают на то, что при перитоните ацилирование холестерина угнетается (в пользу этого также свидетельствует рост доли плазменного ФХ). При этом на уровень ХС в плазме крови также влияют интенсивность его обмена с клеточными структурами крови и в конечном итоге его метаболизм в печени. По-видимому, отсутствие выраженной динамики содержания ХС в крови отражает адекватную патологическому процессу активность метаболических систем, обеспечивающих поддержание стационарного уровня ХС, компенсируя недостаточность образования его этерифицированных форм.

Резкое увеличение уровня СЖК на фоне повышения доли лизоформ ФЛ — следствие высокой активности фосфолипазы  $A_2$  в тканевых структурах и в крови. Однако стойкое повышение содержания СЖК и ЛФЛ может рассматриваться в качестве деструктивного фактора, поскольку в высоких концентрациях эти соединения обладают хаотропным действием и могут оказывать как на липопротеиновые частицы крови, так и на биомембраны клеточных структур структуродеформирующий эффект, повышая риск их окислительной модификации. В то же время увеличение уровня СЖК в плазме крови может свидетельствовать о компенсаторном запуске липолиза депонированных нейтраль-

**Уровень диеновых ( $A_{233}/A_{215}$ ) и триеновых конъюгатов ( $A_{275}/A_{215}$ ) в крови, тканях печени и кишечника у собак**

Источник	В норме	При перитоните
Плазма крови	$0,66 \pm 0,07$	$0,91 \pm 0,02^*$
	$0,22 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,02^{***}$
Печень	$0,32 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,03^{***}$
	$0,12 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,04^{**}$
Кишечник	$0,60 \pm 0,02$	$0,88 \pm 0,09^*$
	$0,14 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,03^*$

*Примечание.* В числителе — показатели диеновых конъюгатов, в знаменателе — показатели триеновых конъюгатов.

\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

Таблица 3

**Влияние ингибиторов фосфолипаз на уровень ТБК-активных продуктов (нмоль/г) в тканях кишечника и печени при перитоните**

Условия опыта	В тканях	
	кишечника	печени
Контроль	$8,7 \pm 0,28$	$15,0 \pm 0,73$
Перитонит	$15,2 \pm 0,95$	$33,45 \pm 3,1$
Перитонит при использовании		
бромфенацилбромида	$11,8 \pm 1,02^*$	$21,4 \pm 1,84^{**}$
PMSF	$11,8 \pm 1,44^*$	$28,4 \pm 3,57$
LiCl	$11,0 \pm 0,86^*$	$26,23 \pm 2,4^*$
хлорпромазина	$12,1 \pm 0,72^*$	$22,3 \pm 3,35^*$

\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$ .

ных жиров как необходимым этапе обеспечения энергетических затрат, возрастающих при патологии. При перитоните в плазме крови увеличивается относительное содержание ТГЛ, и явление гипертриглицеридемии, по-видимому, характеризует перестройку обмена нейтральных жиров, выступающих в качестве важнейшего субстрата энергетических процессов в организме, а также свидетельствует о росте метаболической активности печени и перестройке окислительного метаболизма в тканях и органах при перитоните. В этой связи отметим, что направленность и глубина метаболических сдвигов в спектре липидов плазмы крови могут служить информативным критерием тяжести патологического процесса в организме.

В целом, изменения в спектре тканевых липидов и липидов плазмы крови являются важными качественными и количественными характеристиками изменения липидного обмена при перитоните.

Весомым фактором дисгармонии в обмене липидов при перитоните может выступать интенсификация процессов ПОЛ, обнаруживаемая через накопление начальных продуктов — диеновых и триеновых конъюгатов, определяемых непосредственно в липидах (табл. 2), а также токсичных ТБК-активных продуктов, среди которых основная доля принадлежит малоновому диальдегиду.

При перитоните в тканях кишечника и печени ТБК-активные продукты накапливаются в значительных количествах, превышая контрольные значения соответственно в 1,8 и 2,2 раза (табл. 3). В плазме крови уровень ТБК-активных продуктов при перитоните превышает контроль ( $1,70 \pm 0,33$  нмоль/мл) в 2,4 раза. Активность ключевого фермента антиоксидантной системы — супероксиддисмутазы в тканях кишечника и печени в норме составляет соответственно  $2,85 \pm 0,20$  и  $3,24 \pm 0,36$  усл.ед./мг белка. При перитоните активность супероксиддисмутазы в ткани кишечника понижается на 44,6%, в печени — на 30,3%. В плазме крови супероксиддисмутазная активность в норме составляет  $1,02 \pm 0,23$  усл.ед./мг белка и при перитоните обнаруживает тенденцию к пониже-

нию. Динамика активности супероксиддисмутазы характеризует некоторые особенности патофизиологического процесса, в частности позволяет оценивать уровень оксидативного стресса, который имеет место в патогенезе перитонита.

Для клетки осуществление строгого регуляторного контроля за протеканием свободнорадикальных процессов ПОЛ является актуальной задачей. Нами с помощью специфического ингибиторного анализа предпринята попытка выявления влияния липидзависимых сигнальных систем, которые, как свидетельствуют данные об изменениях в спектре тканевых липидов, при перитоните характеризуются высокой активностью на интенсивность процессов ПОЛ.

Для этой цели в опытах *in vitro* использованы ингибиторы фосфолипаз — ключевых ферментов запуска липидзависимых сигнальных систем (табл. 3).

Блокатор фосфолипазы А<sub>2</sub> 4-бромфенацилбромид (10 мкмоль) [12] ограничивает интенсивность процессов ПОЛ, понижая при перитоните содержание ТБК-активных продуктов в тканях кишечника и печени соответственно на 20% и 36%. Фенилметансульфонилфторид — PMSF (1 ммоль) является ингибитором фосфоинозитидспецифичной фосфолипазы С и в целом сериновых протеаз [6, 19], способствует понижению содержания ТБК-активных продуктов в тканях кишечника на 24% и печени на 15%. Другой модификатор ФИ-цикла хлорид лития (10 ммоль) — ингибитор инозитмонофосфатазы и фосфолипазы С [21] — приводит к уменьшению количества ТБК-активных продуктов при перитоните в тканях кишечника и печени соответственно на 29% и 21,6%. Ингибитор протеинкиназы С хлорпромазин (20 мкмоль), оказывающий на обмен фосфолипидов модифицирующее влияние [6, 11], в тканях кишечника и печени при перитоните понижает содержание ТБК-активных продуктов при перитоните соответственно на 22% и 33,3%. Отмечено, что ни один из использованных ингибиторов не влиял на процессы перекисления тканевых липидов в норме.

Полученные результаты указывают на наличие зависимости между интенсивностью ПОЛ и состоянием липидзависимых сигнальных систем, основными “рабочими инструментами” которых выступают фосфолипазы. Поэтому ингибирование липидзависимых сигнальных систем сопровождается понижением интенсификации перекисления тканевых липидов. В свою очередь, процессы ПОЛ инициируют целый комплекс физико-химических перестроек в биомембранах, стимулируя биохимические перестройки в составе липидов, изменяя микровязкость, текучесть, мембранный потенциал, полярность внутренних областей мембраны [1, 2, 8]. Перекисление липидов является важным атрибутом патогенеза перитонита и служит деструктивным фактором, поскольку его интенсификация в крайнем своем проявлении ведет к реорганизации бислойной жидко-кристаллической структуры

биомембран, возникновению зон неспецифической ионной проницаемости, нарушению барьерной функции биомембран [8, 13].

Изменения тканевого липидного обмена играют важную роль в патогенезе перитонита, так как модификация состава и состояния липидов выступают причиной и негативным фоном в развитии мембранно-деструктивных процессов. Этот факт подтверждается значительным ростом уровня СЖК, лизоформ ФЛ и снижением уровня основных мембранных липидов. Изменения в спектрах тканевых липидов кишечника и печени — органах, имеющих различное отношение к патогенному очагу, имеют общую направленность, связанную с высокой активностью гидролитических процессов. Несмотря на сходство патогенетических перестроек, в ткани печени, в отличие от кишечника, изменения в липидном компоненте менее выражены и во многом имеют компенсаторно-приспособительный характер.

Высокая активность фосфолипаз выступает одним из факторов интенсификации процессов перекисного окисления липидов. Поэтому перекиссационные тканевые липиды ограничивают ингибиторы фосфолипаз А<sub>2</sub> и С. В свою очередь, интенсификация свободнорадикальных реакций и понижение антиоксидантного потенциала тканей являются важными факторами модификации липидного обмена. Изменения в составе органических липидов во многом сопоставимы с таковыми на уровне плазмы крови. Отсюда комплексная оценка качественного и количественного состава липидов плазмы крови на предмет содержания ЛФХ, СЖК, суммарных и индивидуальных ФЛ служат адекватным способом определения глубины нарушений липидного обмена на органном уровне.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андарханов Б.В., Лунина Е.А., Ленская Е.Г.// Вопр. мед. химии. — 1990. — № 3. — С. 130—138.
2. Бурлакова Е.Б., Сторожко Н.М., Храпова М.Г.// Биофизика. — 1988. — Вып. 5. — С. 781—786.
3. Васильев В.К.//Биохимия. — 1995. — Вып. 11. — С. 542—548.

4. Гостищев В.К., Сажин В.П., Авдоненко А.Л. Перитонит. — М., 1992.
5. Гуревич В.С., Конторщикова К.Н., Шатилина Л.В.//Лаб. дело. — 1990. — № 4. — С. 44—47.
6. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. — М., 1991.
7. Егоров Д.Ю., Козлов А.В. Природа продуктов ПОЛ, определяемая в сыворотке крови по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой. — М., 1988. — С. 3—13. Деп. в ВИНТИ. 30.08.88. № 6766-В88.
8. Гаган В.Е., Архипенко Ю.В., Меерсон Ф.З., Козлов Ю.П.//Биохимия. — 1983. — Вып. 7. — С. 1141—1248.
9. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. — М., 1975.
10. Кренс Е.М. Липиды клеточных мембран. — Л., 1981.
11. Красильников М.А., Безруков В.М., Шатская В.А.//Биохимия. — 1992. — Вып. 4. — С. 627—636.
12. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е.//Цитология. — 1993. — № 12/12. — С. 3—35.
13. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс, профилактика. — М., 1981.
14. Никитин Ю.П., Курилович С.А., Давидин Г.С. Печень и липидный обмен. — Новосибирск, 1985.
15. Хиггинс Дж. А. Разделение и анализ липидных компонентов мембран/Биологические мембраны. Методы: /Под ред. Дж. Б. Финдлея, У.Г. Эванза. — М., 1990.
16. Хочачка П., Сомеро Дж. Биохимическая адаптация. — М., 1988.

17. Швец В.И., Степанов А.Е., Крылова В.Н., Гулак П.В. Мио-Инозит и фосфоинозитиды. — М., 1987.
18. Шуркалин Б.К., Кригер А.Г., Горский В.А., Владимиров В.Г. Гнойный перитонит. — М., 1993.
19. Harris R.A., Fenner D., Leslie S.W.// Life Sciences. — 1983. — Vol. 32. — P. 2661—2666.
20. Hodgson Humphrey J.F.// J. Roy. Coll. Physicians London. — 1993. — Vol. 27. — P. 278—283.
21. Lee Chang Ho, Dixon J.F. et al.// Biochem. J. — 1992. — Vol. 282. — P. 377—385.

Поступила 14.05.98.

## QUALITATIVE AND QUANTITATIVE CUANYES OF LIPIDS IN EXPERIMENTAL PERITONITIS

V.A. Trofimov, A.P. Vlasov, M.M. Minnebaev

### S u m m a r y

The considerable increase of the free fatty acids part, phospholipid lysophorms and the decrease of the main membrane lipids level are found in tissue lipids spectrum in peritonitis. The changes in organ lipids composition in many cases are correlated with those in blood plasma. Hence, the complex estimation of blood lipids is an adequate method of determining the biochemical lipid disorders intensity on the organ level.