

УДК 615.015.1

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПЕРИТОНИТА

**Мирошниченко А.Г., Брюханов В.М., Бутакова Л.Ю., Госсен И.Е.,
Перфильев В.Ю., Смирнов П.В.**

*ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Барнаул, e-mail: ag@asmu.ru*

Проведено сравнительное изучение влияния антиоксидантов (аскорбиновая кислота, метилэтилпиридинол, N-ацетилцистеин, 80 мг/кг) на течение экспериментального перитонита, вызванного *Escherichia coli* или *Klebsiella pneumoniae*. Исследование выполнено на 70 крысах-самцах линии Вистар в возрасте 2–3 месяцев массой 190–290 г. Экспериментальный перитонит, вызванный грамотрицательными микроорганизмами, сопровождается оксидативным стрессом (повышается концентрация тиобарбитурат-реактивных продуктов с одновременным снижением концентрации восстановленного глутатиона и активности глутатионпероксидазы, компенсаторно повышается активность каталазы), поэтому применение антиоксидантов является патогенетически оправданным. Антиоксидантная терапия в некоторой степени снижает выраженность оксидативного стресса, но не уменьшает воспалительную реакцию. Метилэтилпиридинол проявляет также выраженный протективный эффект в отношении печени и почек. Несомненно, важным условием применения антиоксидантов в комплексной терапии больных с бактериальными инфекциями является отсутствие влияния на активность антибактериальных средств.

Ключевые слова: антиоксиданты, перитонит, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, оксидативный стресс

EFFECT OF SOME ANTIOXIDANTS ON EXPERIMENTAL PERITONITIS

**Miroshnichenko A.G., Bryukhanov V.M., Butakova L.Y., Gossen I.E.,
Perfilyev V.Y., Smirnov P.V.**

Altai state medical university, Barnaul, e-mail: ag@asmu.ru

Was conducted a comparative study of the effect of antioxidants (ascorbic acid, methylethylpyridinol, N-acetylcysteine, 80 mg/kg) on experimental peritonitis caused by *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. The study was performed on 70 Wistar rats aged 2–3 months, weighing 190–290 g experimental peritonitis caused by gram-negative microorganisms, is accompanied by oxidative stress (increased concentration thiobarbiturate-reactive substances with a simultaneous decrease in the concentration of reduced glutathione and the activity glutathione peroxidase, catalase activity increased compensatory), so application of antioxidants is pathogenetically justified. Antioxidant therapy to some extent reduces the severity of oxidative stress but does not reduce the inflammatory reaction. Methylethylpyridinol also exhibits pronounced protective effect against the liver and kidneys. Undoubtedly, the essential condition for antioxidants in the treatment of patients with bacterial infections is the lack of effect on the activity of antibacterial agents.

Keywords: antioxidants, peritonitis, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, oxidative stress

Перитонит остается одной из основных причин летальности при острых хирургических заболеваниях брюшной полости. Известна важная патогенетическая роль перекисного дисбаланса при гнойно-воспалительных процессах, в том числе и перитоните, и в формировании полиорганной недостаточности как основной причины летальных исходов [3]. В связи с этим актуальным является изучение эффектов антиоксидантов на течение перитонита. При этом важным является комплексная оценка влияния препаратов, включающая в себя мониторинг как маркеров окислительного стресса, так и маркеров поражения органов (прежде всего, печени и почек).

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение влияния антиоксидантов (аскорбиновая кислота, метилэтилпиридинол, N-ацетилцистеин) на течение экспериментального перитонита, вызванного *Escherichia coli* или *Klebsiella pneumoniae*.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на 70 крысах-самцах линии Вистар в возрасте 2–3 месяцев массой 190–290 г, полученных из питомника НИИ цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Содержание крыс соответствовало требованиям Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.), Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей» (Страсбург, 1986 г.). Соответственно изучаемым микроорганизмам эксперимент был разделен на 2 серии по 35 животных в каждой (5 групп по 7 особей). В каждой серии животным первой группы однократно вводился стерильный изотонический раствор хлорида натрия, животным остальных групп – бактериальная суспензия (2,5 усл. ед. по Мак-Фарланду, 5 мл/кг), полученная из суточной чистой культуры клинического штамма *E. coli* или *Klebsiella pneumoniae*. Спустя 3 часа после инъекции животным первой («К») и второй («П») групп внутрибрюшинно вводился стерильный изотонический раствор хлорида натрия, третьей группы («АСК») – раствор аскорбиновой кислоты (Panreas, Испания), четвертой группы («МЭП») – раствор метилэтилпиридинола (ФГУП МЭЗ, Россия), пятой группы

(«НАЦ») – раствор N-ацетилцистеина (Sigma-Aldrich, США). Еще через 3 часа стерильный изотонический раствор хлорида натрия и лекарственные препараты вводились повторно. Растворы для инъекций готовились из субстанций в асептических условиях (за исключением метилэтилпиридинола и изотонического раствора NaCl) непосредственно перед введением. Все антиоксиданты применялись в дозе 80 мг/кг, установленной в соответствии с правилами межвидового переноса на основании терапевтических доз, применяемых у человека [8].

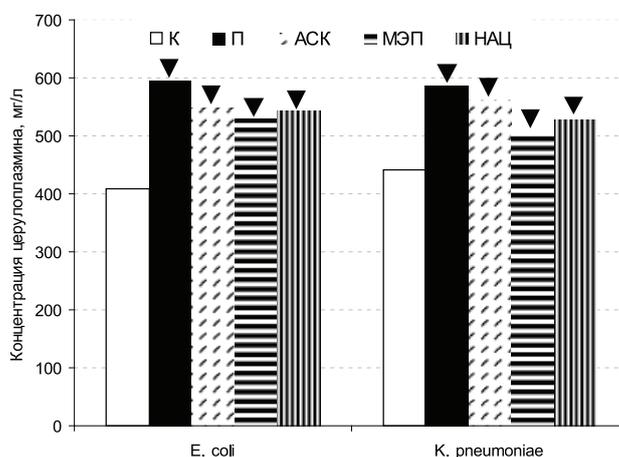
Через 24 часа после введения бактериальной суспензии с помощью диагностических наборов (ООО «Витал Диагностика СПб», Россия) в качестве маркеров поражения печени определялись активность аланинаминотрансферазы и щелочной фосфатазы, маркеров поражения почек – концентрации мочевины и креатинина. Для оценки оксидантного статуса определяли активность каталазы [4] и глутатионпероксидазы эритроцитов [5], а также плазменные концентрации восстановленного глутатиона [9] и ти-

обарбитурат-реактивных продуктов [1], в качестве маркера воспаления – концентрацию церулоплазмينا в плазме крови, проявляющего также антиоксидантные свойства [13].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни с помощью программы SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc., США), различия считали значимыми при $P < 0,05$ [2].

Результаты исследования и их обсуждение

Введение взвеси микроорганизмов приводит к активному развитию воспаления – перитониту. Об этом свидетельствует повышение концентрации церулоплазмينا в плазме крови крыс обеих серий. Оно носит статистически значимый характер и не поддается коррекции исследуемыми антиоксидантами (рисунок).



Влияние антиоксидантов на концентрацию церулоплазмينا при экспериментальном перитоните (▼ – значимое различие с контрольной группой («К») серии, $p < 0,05$)

Перитонит, вызванный кишечной палочкой, сопровождается небольшим (на 25%), но статистически значимым повышением маркера дисфункции печени – аланинаминотрансферазы (АЛТ). Введение антиоксидантов уменьшает указанный эффект (табл. 1). *Klebsiella pneumoniae* вызывает более тяжелое поражение печени, при этом гепатопротекторное действие оказывает только метилэтилпиридинол. Обращает также на себя внимание и повышение креатинина плазмы при перитоните, вызванном клебсиеллой, что может объясняться почечной дисфункцией. При этом отсутствие повышения концентрации мочевины обусловлено снижением ее синтеза в печени. Нарушение функции почек уменьшается введением аскорбиновой кислоты или метилэтилпиридинола.

Оба микроорганизма вызывают выраженный оксидативный стресс: повышается активность каталазы, концентрация тиобарбитурат-реактивных продуктов с одновременным снижением концентрации восстановленного глутатиона и активности глутатионпероксидазы. *Klebsiella pneumoniae* по сравнению с кишечной палочкой вызывает более выраженное усиление процессов пероксидации. Наиболее выраженной антиоксидантной активностью в условиях экспериментального перитонита у животных обеих серий обладает метилэтилпиридинол (табл. 2).

Генерация активных форм кислорода и концентрация малонового диальдегида – продукта ПОЛ – повышаются в условиях сепсиса, которым сопровождается перитонит [11, 14]. Важными эффектами

бактериальных эндотоксинов являются ингибирование метаболизма глюкозы, липидного обмена, повышение образования свободных радикалов, интенсивности перекисного окисления липидов и повреждение клеток [10]. Снижение содержания восстановленного глутатиона может быть связано

с экспортом окисленной формы, а также со снижением активности глутатионредуктазы. Возможной причиной могут быть снижение образования NADPH, необходимого для восстановления глутатиона, вследствие угнетения работы пентозофосфатного шунта в кислой среде воспалительного очага [12].

Таблица 1

Влияние антиоксидантов на поражение печени и почек в условиях экспериментального перитонита

Группа	АЛТ, мкмоль/(с×л)	ЩФ, нмоль/(с×л)	Мочевина, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л
<i>Escherichia coli</i>				
К	1,09 (0,88; 1,19)	1565,8 (1373,5; 1942,3)	2,03 (1,77; 2,45)	57,08 (52,32; 59,21)
П	1,36 (1,28; 1,44)*	1460,6 (1136,8; 1659,7)	2,28 (1,90; 2,45)	57,08 (51,14; 59,40)
АСК	1,29 (1,11; 1,30)	1571,8 (1453,9; 1674,0)	1,64 (1,57; 2,59)	47,32 (45,25; 54,26)
МЭП	0,99 (0,98; 1,13)	1604,9 (1520,7; 1678,5)	2,26 (1,86; 2,35)	56,58 (48,38; 59,33)
НАЦ	1,25 (1,05; 1,34)	1565,8 (1360,7; 1754,4)	2,11 (1,79; 2,34)	54,08 (47,13; 56,58)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
К	1,24 (1,09; 1,47)	1397,5 (1205,2; 1537,3)	2,17 (1,97; 2,49)	55,33 (51,07; 60,09)
АБ	1,75 (1,55; 1,78)*	1544,8 (1220,9; 1765,7)	2,04 (1,72; 2,33)	66,84 (61,09; 71,73)*
АСК	1,76 (1,61; 2,01)*	1571,8 (1262,3; 1738,6)	2,37 (1,94; 2,62)	64,84 (56,77; 78,42)
МЭП	1,55 (1,42; 2,13)	1550,8 (1269,0; 1578,6)	2,19 (1,88; 2,34)	60,59 (53,33; 65,66)
НАЦ	1,76 (1,57; 2,11)*	1574,8 (1320,1; 1746,9)	2,34 (1,99; 2,61)	66,84 (61,65; 72,16)*

Пр и м е ч а н и е . * – значимое различие с контрольной группой («К») серии ($p < 0,05$).

Таблица 2

Влияние антибактериальных средств на свободнорадикальное окисление и его коррекция антиоксидантами

Группа	КАТ, % на мг Нб	ВГ, мкмоль/г Нб	ГПО, мкмоль/(мин·л)	ТБРП, мкМ
<i>Escherichia coli</i>				
К	0,027 (0,018; 0,042)	0,97 (0,79; 1,00)	18,80 (16,92; 23,14)	3,37 (2,83; 4,20)
П	0,051 (0,047; 0,053)*	0,56 (0,52; 0,68)*	13,89 (11,04; 16,41)*	4,84 (4,32; 5,08)*
АСК	0,042 (0,035; 0,052)*	0,68 (0,61; 1,03)	16,95 (14,29; 20,76)	4,26 (3,85; 4,97)
МЭП	0,041 (0,032; 0,043)	0,78 (0,71; 0,95)	17,49 (16,97; 17,99)	3,80 (3,43; 4,10)
НАЦ	0,035 (0,033; 0,043)	0,65 (0,56; 0,67)*	15,44 (13,85; 18,17)	4,50 (3,78; 4,76)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
К	0,027 (0,024; 0,036)	0,82 (0,74; 0,85)	17,95 (17,11; 22,05)	3,68 (3,39; 4,21)
АБ	0,052 (0,045; 0,053)*	0,45 (0,38; 0,54)*	14,83 (12,87; 16,80)*	5,23 (4,79; 5,80)*
АСК	0,051 (0,049; 0,053)*	0,56 (0,50; 0,66)*	16,58 (12,83; 17,08)*	4,81 (3,97; 5,44)*
МЭП	0,042 (0,034; 0,044)	0,67 (0,55; 0,85)	18,78 (17,79; 19,29)	4,15 (3,69; 4,54)
НАЦ	0,044 (0,042; 0,050)*	0,47 (0,37; 0,61)*	17,79 (15,21; 19,02)	5,19 (3,81; 5,59)

Пр и м е ч а н и е . * – значимое различие с контрольной группой серии ($p < 0,05$).

Несмотря на доказанное цитотоксическое действие свободных радикалов, введение антиоксидантов не всегда приводит к уменьшению органной дисфункции. Наиболее эффективное органопротективное действие оказал метилэтилпиридинол, что может объясняться его антибактериальной активностью в отношении исследуемых

штаммов, установленной нами в результате исследований *in vitro* [6, 7]. В связи с этим очевидно, что в условиях бактериальной инфекции с целью коррекции оксидативного стресса наиболее целесообразно применять антиоксиданты, которые дополнительно оказывают антибактериальное действие.

Заключение

Экспериментальный перитонит, вызванный грамотрицательными микроорганизмами, сопровождается оксидативным стрессом, поэтому применение антиоксидантов является патогенетически оправданным. Антиоксидантная терапия в некоторой степени снижает выраженность оксидативного стресса, но не уменьшает воспалительную реакцию. Метилэтилпиридинол, антибактериальные свойства которого были установлены ранее, проявляет также выраженный органопротективный эффект. Несомненно, важными условиями применения антиоксидантов в комплексной терапии больных с бактериальными инфекциями являются отсутствие влияния на активность антибактериальных средств, а также комплексный биохимический мониторинг, включающий в себя как оценку маркеров оксидативного стресса, так и маркеров органной дисфункции.

Список литературы

1. Гаврилов В.Б. Определение ТБК-реагирующих продуктов в тканях / В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, М.Л. Мажуль // *Вопр. мед. химии.* – 1987. – Т. 33. – № 1. – С. 117–123.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1990 – 352 с.
3. Кашафеева А.А. Состояние перекисного статуса брюшины при экспериментальном перитоните у крыс / А.А. Кашафеева, С.Г. Гаймоленко, Б.С. Хышиктеев, А.Г. Гончаров // *Дальневосточный медицинский журнал.* – 2009. – № 3. – С. 89–92.
4. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1. – С. 16–19.
5. Минаева Л.В. Экспериментальная оценка роли изменения системы глутатиона в реализации побочных цитотоксических эффектов повторного введения циклофосфана дисс. канд. мед. наук : 14.00.20, 03.00.04. – СПб., 2007. – 178 с.
6. Мирошниченко А.Г. Влияние антиоксидантов на развитие чистой культуры *Escherichia coli* и ее чувствительность к гентамицину / А.Г. Мирошниченко, В.М. Брюханов, Л.Ю. Бутакова, И.Е. Госсен, В.Ю. Перфильев, П.В. Смирнов // *Фундаментальные исследования.* – 2013. – № 5 (часть 2). – С. 339–343.
7. Мирошниченко, А.Г. Влияние антиоксидантов на развитие штаммов *Klebsiella pneumoniae* / А.Г. Мирошниченко, В.М. Брюханов, Л.Ю. Бутакова, И.Е. Госсен, В.Ю. Перфильев, П.В. Смирнов // *Фундаментальные исследования.* – 2013. – № 2 (часть 1). – С. 121–125.
8. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. члена-корреспондента РАМН, профессора П.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО Изд-во «Медицина», 2005. – 832 с.
9. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – Vol. 82. – № 1. – P. 70–77.
10. Halliwell B. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge // *Biochem. J.* – 1984. – Vol. 219. – P. 744–752.
11. Lalonde C. Relationship between liver oxidant stress and antioxidant activity after zymosan peritonitis in the rat / C. Lalonde, R. Daryani, C. Campbell, J. Know, Y.K. Youn, R. Demling // *Crit. Care Med.* – 1993. – P. 894–900.
12. Ravin H.A. An improved colorimetric enzymatic assay for caeruloplasmin. // *J. Lab. Clin. Med.* – 1961. – Vol. 58. – P. 161.
13. Reilly P.M. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites / P.M. Reilly, W. Schiller, G.B. Bulkley // *Am. J. Surg.* 1991. Vol. 161. pp. 488–503.
14. Sugeno K. The role of lipid peroxidation in endotoxin induced hepatic damage and the protective effect of antioxidants / K. Sugeno, K. Dahi, K. Yamada // *Surgery.* 1987. Vol. 101. pp. 746–752.

References

1. Gavrilov V.B. Opredelenie TБК-reagirujushih produktov v tkanjah / V.B. Gavrilov, A.R. Gavrilova, M.L. Mazhul // *Vopr. med. himii.* 1987. T. 33. no. 1. pp. 117–123.
2. Lakin G.F. Biometrija: Ucheb. posobie dlya biol. spec. vuzov. 4-e izd., pererab. i dop. M.: Vyssh. shk., 1990 352 p.
3. Kashafeeva A.A. Sostojanie perekisnogo statusa brjushiny pri jeksperimental'nom peritonite u krysv / A.A. Kashafeeva, S.G. Gajmolenko, B.S. Hyshiktuev, A.G. Goncharov // *Dal'nevostochnyj medicinskij zhurnal.* 2009. no. 3. pp. 89–92.
4. Koroljuk M.A. Metod opredelenija aktivnosti katalazy / M.A. Koroljuk // *Lab. delo.* 1988. no. 1. pp. 16–19.
5. Minaeva L.V. Eksperimental'naja ocenka roli izmenenija sistemy glutatiiona v realizacii pobochnyh citotoksicheskikh jeffektov povtornogo vvedenija ciklofosfana : diss. kand. med. nauk : 14.00.20, 03.00.04. SPb, 2007. 178 p.
6. Miroshnichenko A.G. Vlijanie antioksidantov na razvitiye chistoj kul'tury *Escherichia coli* i ee chuvstvitel'nost' k gentamicinu / A.G. Miroshnichenko, V.M. Brjuhanov, L.Ju. Butakova, I.E. Gossen, V.Ju. Perfil'ev, P.V. Smirnov // *Fundamental'nye issledovaniya.* 2013. no. 5 (chast' 2). pp. 339-343.
7. Miroshnichenko A.G. Vlijanie antioksidantov na razvitiye shtammov *Klebsiella pneu-moniae* / A.G. Miroshnichenko, V.M. Brjuhanov, L.Ju. Butakova, I.E. Gossen, V.Ju. Perfil'ev, P.V. Smirnov // *Fundamental'nye issledovaniya.* 2013. no. 2 (chast' 1). pp. 121–125.
8. Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakolo-gicheskikh veshhestv / Pod obshej redakciej chlena-korrespondenta RAMN, professora R.U. Habrieva. 2-izd., pererab. i dop. M.: OAO «Izdatel'stvo «Medicina», 2005. 832 p.
9. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // *Arch. Biochem. Biophys.* 1959. Vol.82. N.1. P. 70–77.
10. Halliwell B. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge // *Biochem. J.* 1984. Vol. 219. pp. 744–752.
11. Lalonde C. Relationship between liver oxidant stress and antioxidant activity after zymosan peritonitis in the rat / C. Lalonde, R. Daryani, C. Campbell, J. Know, Y.K. Youn, R. Demling // *Crit. Care Med.* 1993. pp. 894–900.
12. Ravin H.A. An improved colorimetric enzymatic assay for caeruloplasmin. // *J. Lab. Clin. Med.* 1961. Vol. 58. pp. 161.
13. Reilly P.M. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites / P.M. Reilly, W. Schiller, G.B. Bulkley // *Am. J. Surg.* 1991. Vol. 161. pp. 488–503.
14. Sugeno K. The role of lipid peroxidation in endotoxin induced hepatic damage and the protective effect of antioxidants / K. Sugeno, K. Dahi, K. Yamada // *Surgery.* 1987. Vol. 101. pp. 746–752.

Рецензенты:

Смирнов И.В., д.м.н., зав. кафедрой фармакогнозии и ботаники, ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России, г. Барнаул;
Галактионова Л.П., д.б.н., профессор кафедры биохимии и клинической лабораторной диагностики, ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава России, г. Барнаул.

Работа поступила в редакцию 05.12.2013.