

А.Н. Осипенко ¹, А.В. Марочков ², Н.В. Акулич ¹

ДИСФУНКЦИЯ ПЕРОКСИСОМ КАК ОДНА ИЗ ВОЗМОЖНЫХ ПРИЧИН РАЗВИТИЯ СИНДРОМА ПОЛИОРГАННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

¹ УО «Могилевский государственный университет им. А.А. Кулешова» (Могилев, Республика Беларусь)

² УЗ «Могилевская областная больница» (Могилев, Республика Беларусь)

Представлены результаты исследования жирных альдегидов и общего холестерина плазмы крови пациентов с синдромом полиорганной недостаточности. На основании выявленного значительного снижения уровня анализируемых соединений делается вывод о возможном наличии дисфункции пероксисом при этом синдроме. Приводятся литературные данные, указывающие на важную роль пероксисом в формировании значительных метаболических нарушений и развития воспалительных реакций.

Ключевые слова: жирные кислоты, жирные альдегиды, плазмалогенные фосфолипиды, холестерин, синдром полиорганной недостаточности

DYSFUNCTION OF PEROXISOMES AS ONE OF POSSIBLE CAUSES OF DEVELOPMENT OF MULTIPLE ORGAN DYSFUNCTION SYNDROME

A.N. Osipenko ¹, A.V. Marochkov ², N.V. Akulich ¹

¹ Mogilev State University named after A.A. Kuleshov, Mogilev, Belarus

² Mogilev Regional Hospital, Mogilev, Belarus

The article presents the results of researches of fatty aldehydes and total cholesterol of blood plasma of patients with multiple organ dysfunction syndrome. On the basis of determined significant decrease of analyzed compounds level we concluded about possibility of peroxysomal dysfunction at this syndrome. The article cites literary data that indicate significant role of peroxisomes in the formation of severe metabolic disturbances and the development of inflammatory reactions.

Key words: fatty acids, fatty aldehydes, plasmalogen phospholipids, cholesterol, multiple organ dysfunction syndrome

Одной из наиболее важных составляющих развития синдрома полиорганной недостаточности (СПОН) является существенное изменение клеточного метаболизма. Существует необходимость разработки концепции своевременной диагностики и адекватной коррекции метаболических нарушений на фоне системной дисфункции с помощью доступных и эффективных методов лечения, основанных на глубоком понимании основных звеньев патогенеза СПОН [3, 5]. В связи с этим особую актуальность имеют исследования, направленные на поиск путей коррекции метаболизма тканей и органов при этом синдроме [5]. Нам представляется перспективным направлением определение роли веществ различной химической природы — вероятных участников развития системной дисфункции. В последнее время показано, что изменение содержания некоторых соединений сопряжено с нарушением функции сразу нескольких систем органов. Одними из таких соединений являются вещества, связанные с функционированием клеточных пероксисом [1, 15].

Известно, что при врожденных заболеваниях, связанных с нарушением биогенеза пероксисом (НБП), таких, как церебροгепаторенальный синдром Цельвегера и адренолейкодистрофия, как и при полиорганной недостаточности, наблюдается нарушение нескольких систем органов. В частности, как и при СПОН, при НБП параллельно прогрессируют неврологическая симптоматика

развиваются нарушения в работе печени, почек, дыхательной системы, что, в зависимости от выраженности дисфункции пероксисом, обычно приводит к гибели организма в течение первых месяцев или лет жизни [1, 10, 15].

Пероксисомы являются обязательными органеллами всех клеток организма (кроме эритроцитов), однако максимальное их количество наблюдается в гепатоцитах, что связано с первостепенной ролью пероксисом в процессах детоксикации. В них показано наличие оксидаз, окисляющих такие токсические субстраты, как фенол, муравьиная кислота, формальдегид, этанол [1, 15]. Пероксисомы являются органеллами, в которых оксидазы катаболизируют эндогенные сигнальные молекулы; так, деградация простагландинов и лейкотриенов является их типичной функцией, в результате которой происходит регуляция воспалительных реакций [6]. В пероксисомах поглощенный кислород переходит в перекись водорода, образование которой, как и других активных форм кислорода (АФК), есть реакция клеток в синдроме системного воспалительного ответа. При этом защита клеток от токсического действия АФК обеспечивается антиоксидантными ферментами, среди которых важная роль отводится пероксисомальным каталазам. Нарушение синтеза этих ферментов приводит к развитию поражений нервной ткани, которые наблюдаются и при полном отсутствии пероксисом, и при нарушении синтеза только пероксисомальных

каталаз [6, 15]. Помимо этого, пероксисомальные ферменты катализируют десятки реакций, среди которых: окисление жирных кислот (ЖК), детоксикация глиоксилата, катаболизм аминокислот [1].

Цель работы: исследование уровня веществ-маркеров дисфункции пероксисом при синдроме полиорганной недостаточности различной этиологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе лаборатории экологической физиологии Регионального центра коллективного пользования УО «Могилевский государственный университет им. А.А. Кулешова» и реанимационно-анестезиологического отделения УЗ «Могилевская областная больница».

Объектом исследования явились 18 человек с синдромом полиорганной недостаточности (возраст — $35,6 \pm 8,7$ лет) различной этиологии. Причиной развития СПОН послужили следующие нозологические формы: острый деструктивный панкреатит (6 человек); хронический рецидивирующий панкреатит (1 человек); грипп H₁N₁, вирусно-бактериальная двусторонняя пневмония (7 человек); тяжелая сочетанная травма (1 человек); ангиодисплазия толстой кишки с рецидивирующими кишечными кровотечениями (1 человек); гнойно-некротическая флегмона голени, септический шок (1 человек); антифосфолипидный синдром, рецидивирующая тромбоэмболия легочной артерии (1 человек).

Контролем служила кровь 16 практически здоровых добровольцев в возрасте $37,7 \pm 3,2$ лет.

Преаналитический этап исследования состоял в отделении клеточного компонента от плазмы крови путем центрифугирования. Затем из фиксированных объемов плазмы крови, используя кислотный этаноллиз, готовили растворы производных жирных альдегидов и жирных кислот с последующей экстракцией их гексаном. Далее нами проводился анализ состава и измерение содержания различных жирных альдегидов и жирных кислот плазмы крови, которые присутствовали в гексановом экстракте в виде соответствующих диэтилацеталей и этиловых эфиров.

Анализ жирных альдегидов (ЖА) и жирных кислот плазмы крови проводился методом капиллярной газо-жидкостной хроматографии. Для этого на хроматографической капиллярной колонке с фазой типа SE-30 (газ-носитель — азот) осуществлялось разделение диэтилацеталей ЖА и этиловых эфиров ЖК, полученных в ходе пробоподготовки из эфиров глицерина и холестерина с различными жирными радикалами [2]. Измерения проводились на газовых хроматографах «ГХ-1000» и «ЦВЕТ-800» (РФ) с пламенно-ионизационными детекторами. Идентификация анализируемых соединений осуществлялась с помощью хромато-масс-спектрометрии. Для этого использовался прибор «Finnigan DSQ II» (США).

Количественная оценка содержания диэтилацеталей жирных альдегидов производилась в

процентном отношении к сумме полученных в ходе пробоподготовки этиловых эфиров жирных кислот. Количественная оценка содержания отдельных жирных кислот производилась в процентном отношении к их общей сумме.

Параллельно на биохимическом анализаторе «Hitachi 912» (Япония) с использованием стандартных диагностических наборов фирмы «Roche» (Швейцария) проводилось измерение содержания общего холестерина (ХС) плазмы крови.

Полученные данные представлены в виде значений средних арифметических показателей сравниваемых групп и соответствующих значений доверительного интервала при $p = 0,05$. Нормальность распределения значений переменных в анализируемых выборках была подтверждена с помощью критериев Колмогорова — Смирнова и Шапиро — Уилка ($p = 0,05$). Оценка достоверности различий между выборками осуществлялась с использованием U-критерия Манна — Уитни, который позволяет оперировать выборками с небольшим количеством наблюдений [4]. Изменения считались значимыми при $p < 0,05$.

Протокол исследования был одобрен Этическими комитетами участвующих клинических центров. Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice), принципами Хельсинской декларации и рационально спланировано с учетом минимизации инвазивных процедур для испытуемых, так как необходимые данные не могли быть получены без привлечения к исследованию людей. Исследование служило получению новых данных об изучаемой патологии, получению результатов, направленных на совершенствование диагностики и лечения, и базировалось на лабораторных данных и углубленном знании проблемы. Ожидаемая польза от исследования превышала потенциальный риск, который являлся минимальным и не превышал риск, существующий при выполнении обычных диагностических процедур, связанных с биохимическим анализом крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время существуют свидетельства того, что уровень общего холестерина крови является одним из маркеров дисфункции пероксисом. Показано снижение уровня ХС плазмы крови при заболеваниях, связанных с нарушениями биогенеза пероксисом [13]. Отмечается снижение содержания ХС в плазме крови и некоторых тканях у экспериментальных животных при дефиците этих органелл [11].

В проведенном нами исследовании у пациентов отмечался низкий уровень общего холестерина плазмы крови ($3,22 \pm 0,74$ ммоль/л), что, с учетом вышеказанного, может являться одним из доказательств дисфункции пероксисом при СПОН.

Следует отметить, что гипополипидемические препараты из группы фибратов вызывают выраженную пролиферацию пероксисом. Показано, что их молекулярными мишенями являются ядерные

рецепторы PPAR- и PPAR- (Peroxisome proliferator-activated receptors), активирующие пролиферацию пероксисом [9]. К лигандам этих рецепторов относятся свободные и химически модифицированные ЖК, в том числе окисленные жирные кислоты и эйкозаноиды [6, 9]. Рецепторы PPAR в основном экспрессируются в тканях с высоким уровнем окисления жирных кислот (печень, сердце, почки, мышцах, сосудистой стенке) и вызывают усиление окисления ЖК. Их экспрессия в клетках регулирует процессы синтеза и окисления ЖК в митохондриях и пероксисомах, поддерживая оптимальный уровень потребления энергии [6]. Показано, что активация PPAR- γ адипоцитов снижает поступление жирных кислот в кровь из жировой ткани [9].

Антидиабетические препараты группы тиазолидиндионов также являются агонистами PPAR- γ [6, 12]. В связи с этим интересно отметить, что одной из важнейших особенностей метаболизма при СПОН является толерантность клеток периферических тканей к инсулину и глюкозе. Установлено, что гипергликемия у недиабетиков говорит о гиперметаболической перестройке процессов аэробного гликолиза, наблюдающегося при СПОН [3, 5]. Помимо метаболических изменений, тиазолидиндионы способны модулировать воспалительный ответ. Глюкокортикоиды, осуществляя противовоспалительное действие, также индуцируют синтез PPAR- α [6]. В целом, по мнению некоторых исследователей, PPAR и пероксисомы участвуют в регуляции продолжительности воспалительного процесса и, возможно, являются причиной формирования хронического воспаления [6].

Установлено, что с рецепторами PPAR- α и PPAR- γ взаимодействуют и статины [14]. В связи с этим необходимо отметить, что в обзорной статье [7], оценивающей влияние статинов на исходы лечения у пациентов с инфекционными заболеваниями и сепсисом, показано позитивное действие статинов при сепсисе и полиорганной недостаточности. Результаты исследований показали снижение смертности больных при назначении статинов.

Важным маркером дисфункции пероксисом является дефицит плазмалогенных фосфолипидов. Установлено, что начальные этапы синтеза этих фосфолипидов проходят в пероксисомах, функциональная активность которых определяет содержание указанных соединений в тканях [1, 10, 15]. Первичная -ОН группа в глицероле плазмалогенных фосфолипидов замещена не радикалом жирной кислоты, а радикалом жирного альдегида (в енольной форме) [15]. Имеются данные [10], что окисление АФК жирного альдегида в sn-1 положении остатка молекулы глицерола снижает вероятность окисления полиненасыщенной ЖК, находящейся в sn-2 положении. Показано, что снижение уровня плазмалогенных фосфолипидов в миелине, где их содержание особенно высоко, всегда связано с интенсификацией перекисного окисления полиненасыщенных ЖК в мембранах

клеток нервной ткани и сопровождается различными неврологическими расстройствами [8, 10].

В нашем исследовании у пациентов в состоянии полиорганной недостаточности обнаружено значительное снижение относительного уровня жирных альдегидов в плазме крови (рис. 1), что указывает на снижение уровня плазмалогенных фосфолипидов у этих больных. Так, уровень диэтилацеталей жирных альдегидов по отношению к этиловым эфирам жирных кислот в опытной группе составил всего $0,94 \pm 0,34\%$ против $2,13 \pm 0,42\%$ ($p < 0,001$) в группе контроля. При СПОН в плазме крови также наблюдается увеличение относительного содержания мононенасыщенных жирных кислот и снижение полиненасыщенных ЖК (табл. 1) при практически неизменившемся уровне насыщенных жирных кислот. Увеличение мононенасыщенных жирных кислот и снижение уровня полиненасыщенных ЖК относительно контроля составляет 50,44 % и 22,21 % соответственно, а уровень жирных альдегидов относительно контроля сокращается на 55,87 %.

Таблица 1

Относительный уровень мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот плазмы крови у пациентов с СПОН и здоровых добровольцев, $X \pm \Delta x$ ($p = 0,05$)

Жирные кислоты	Контроль, %	Опыт, %	p
Мононенасыщенные	$18,36 \pm 1,48$	$27,62 \pm 2,27$	$p < 0,001$
Полиненасыщенные	$39,72 \pm 2,13$	$30,90 \pm 2,13$	$p < 0,001$

Показано, что, в отличие от триглицеридов, диацилфосфолипиды и плазмалогенные фосфолипиды участвуют в обмене полиненасыщенных жирных кислот с большим числом двойных связей, таких, как арахидоновая ($C_{20:4}$), дигомо- γ -линоленовая ($C_{20:3}$) и докозагексаеновая ($C_{22:6}$), выступая как промежуточное депо, через которое эти ЖК транспортируются к клеточным мембранам [6, 15]. Таким образом, отношение уровня жирных альдегидов к уровню таких полиненасыщенных жирных кислот плазмы крови может отражать изменение доли плазмалогенных фосфолипидов в сравнении с долей диацилфосфолипидов. По нашим данным, у пациентов с синдромом полиорганной недостаточности относительное содержание этих ПНЖК является более низким в сравнении со здоровыми добровольцами (табл. 2).

Таблица 2

Относительный уровень полиненасыщенных жирных кислот с большим числом двойных связей плазмы крови у пациентов с СПОН и здоровых добровольцев, $X \pm \Delta x$ ($p = 0,05$)

Жирные кислоты	Контроль, %	Опыт, %	p
Арахидоновая	$6,04 \pm 0,59$	$4,50 \pm 0,76$	$p < 0,01$
Дигомо- γ -линоленовая	$1,20 \pm 0,18$	$0,82 \pm 0,20$	$p < 0,05$
Докозагексаеновая	$2,10 \pm 0,38$	$1,54 \pm 0,26$	$p < 0,05$

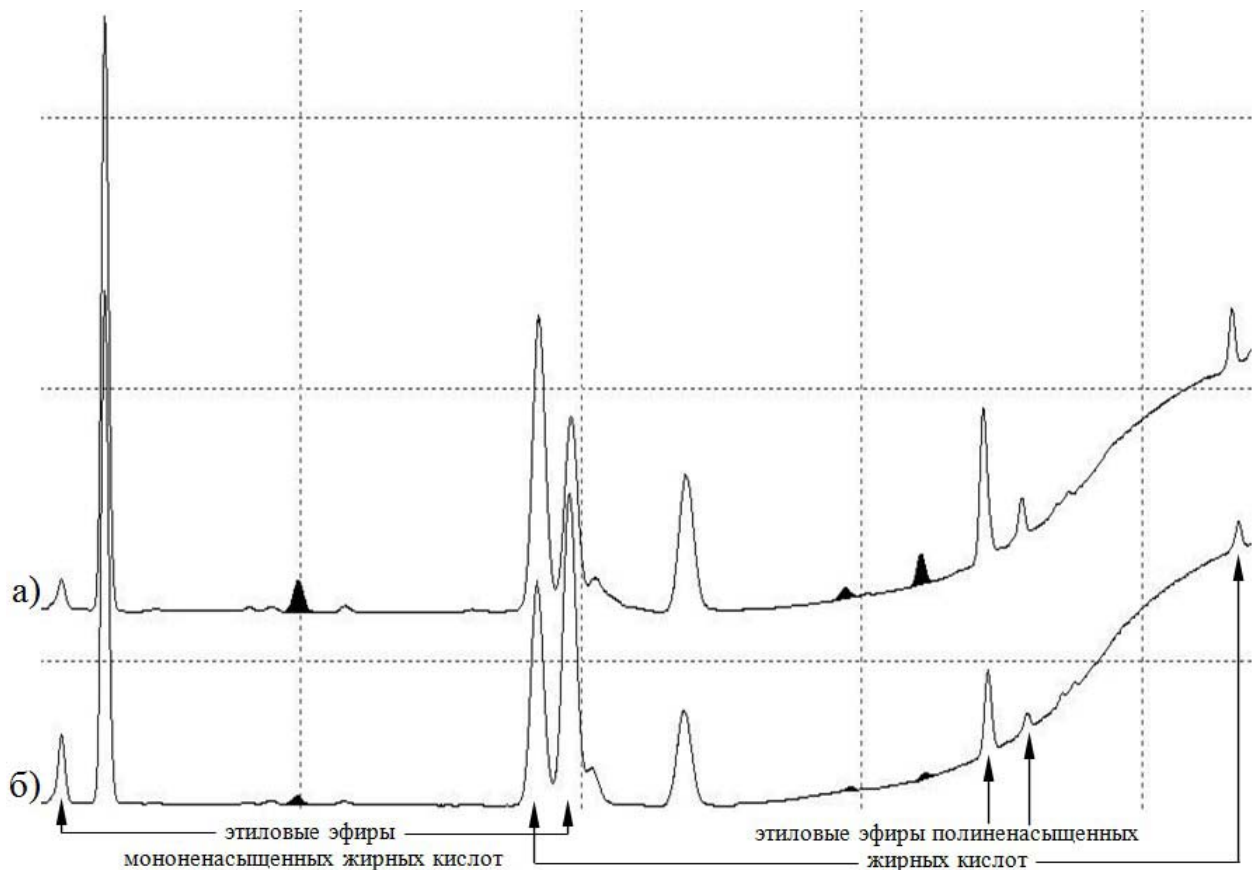


Рис. 1. Хроматограммы, иллюстрирующие снижение уровня полиненасыщенных жирных кислот, увеличение уровня мононенасыщенных жирных кислот и значительное снижение уровня жирных альдегидов плазмы крови при полиорганной недостаточности: **а** – здоровый человек; **б** – пациент с СПОН. Черным выделены пики, соответствующие диэтилацеталам жирных альдегидов.

Тем не менее, отношение жирных альдегидов к сумме арахидоновой, дигомо- γ -гаммаиноленовой и докозагексаеновой полиненасыщенных жирных кислот при СПОН равно 0,14, в то время как в группе контроля этот показатель составляет 0,23 ($p < 0,001$). Таким образом, можно сделать вывод, что уровень плазмалогенных фосфолипидов по отношению к диацилфосфолипидам у пациентов с полиорганной дисфункцией, в сравнении с контролем, снижается практически на 40 %.

В целом, можно заключить, что установленный низкий, по отношению к уровню полиненасыщенных жирных кислот, уровень жирных альдегидов при СПОН также указывает на наступление дисфункции пероксисом, сопровождающейся нарушением обменных процессов и процессов детоксикации, с одной стороны, а с другой — на уязвимость липидов клеточных мембран (особенно мембран нервных клеток) к атакам АФК.

В ряде случаев сниженный уровень жирных альдегидов в плазме крови наблюдался даже тогда, когда спектр ЖК не претерпевал значительных изменений, что указывает на прогностическую значимость этого параметра при оценке критического состояния организма. Данный факт может иметь важное практическое значение, учитывая, что на сегодняшний день все еще не удается определить ранние признаки развития системной дисфункции

[3, 5]. Также до настоящего времени отсутствуют приемлемые для большинства отделений реанимации и интенсивной терапии лабораторные маркеры, свидетельствующие о высокой вероятности развития или наличии гиперметаболических нарушений [3]. Кроме того, все еще остаются вопросы, касающиеся проведения адекватной и своевременной терапии СПОН и контроля результатов ее проведения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами исследование показало снижение уровня холестерина и плазмалогенных фосфолипидов в плазме крови пациентов с полиорганной недостаточностью, что указывает на дисфункцию пероксисом у этих больных. В связи с этим существующая концепция коррекции метаболизма при синдроме полиорганной недостаточности может быть дополнена новыми методами лечения пациентов и контроля их состояния, основанными на более глубоком понимании определенных звеньев патогенеза этого синдрома.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зиновик А.В., Гусина Н.Б. Нарушение биогенеза пероксисом (клиника, диагностика, лечение). — Минск: ГУ РНПЦ «Мать и дитя», 2011. — 30 с.

2. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. — М.: Мир, 1975. — 322 с.
3. Лейдерман И.Н. Синдром полиорганной недостаточности (ПОН). Метаболические основы (Ч. 1) // Вестник интенсивной терапии. — 1999. — № 2. — С. 8—13.
4. Медик В.А., Токмачев М.С., Фишман Б.Б. Статистика в медицине и биологии: руководство: в 2-х т. — М.: Медицина, 2000. — Т. 1: Теоретическая статистика. — 412 с.
5. Саенко В.Ф., Десятерик В.И., Перцева Т.А., Шаповалюк В.В. Сепсис и полиорганная недостаточность. — Кривой Рог: Минерал, 2005. — 466 с.
6. Титов В.Н., Лисицын Д.М. Жирные кислоты. Физическая химия, биология и медицина. — М. — Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2006. — 672 с.
7. Falagas M.E., Makris G.C., Matthaïou D.K., Rafailidis P.I. Statins for infection and sepsis: a systematic review of the clinical evidence // J. Antimicrob. Chemother. — 2008. — Vol. 61, N 4. — P. 774—785.
8. Farooqui A.A., Rapoport S.I., Horrocks L.A. Membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease: deficiency of ethanolamine plasmalogens // J. Neurochem. Res. — 1997. — Vol. 22, N 4. — P. 523—527.
9. Habor A. Peroxisome proliferator activated receptors // Farmacia. — 2010. — Vol. 58, N 5. — P. 13—20.
10. Khan M., Singh J., Singh I. Plasmalogen deficiency in cerebral adrenoleukodystrophy and its modulation by lovastatin // J. Neurochem. — 2008. — Vol. 106, N 4. — P. 1766—1779.
11. Kovacs W.J., Shackelford J.E., Tape K.N. et al. Disturbed cholesterol homeostasis in a peroxisome-deficient PEX2 knockout mouse model // J. Mol. Cell. Biol. — 2004. — Vol. 24, N 1. — P. 1—13.
12. Lebovitz H.E., Banerji M.A. Insulin resistance and its treatment by thiazolidinediones // Recent Prog. Horm. Res. — 2001. — Vol. 56. — P. 265—294.
13. Mandel H., Getsis M., Rosenblat M. et al. Reduced cellular cholesterol content in peroxisome-deficient fibroblasts is associated with impaired uptake of the patient's low density lipoprotein and with reduced cholesterol synthesis // J. Lipid Res. — 1995. — Vol. 36, N 6. — P. 1385—1391.
14. Paumelle R., Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors mediate pleiotropic actions of statins // J. Circulation Res. — 2007. — Vol. 100. — P. 1394—1395.
15. Wanders R.J.A., Waterham H.R. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited // J. Ann. Rev. Biochem. — 2006. — Vol. 75. — P. 295—332.

Сведения об авторах

Осипенко Александр Николаевич — специалист Регионального центра коллективного пользования исследовательским оборудованием и приборами УО «Могилевский государственный университет им. А.А. Кулешова» (212022, Республика Беларусь, г. Могилев, ул. Космонавтов, 1; тел.: 8 (10375222) 28-37-67; e-mail: alosipenko@yandex.ru)

Марочков Алексей Викторович — доктор медицинских наук, заведующий отделением реанимации УЗ «Могилевская областная больница» (212026, Республика Беларусь, г. Могилев, ул. Бельницкого-Бирюли, 12; тел.: 8 (10375222) 27-87-55; факс: 8 (10375222) 27-86-98; e-mail: marochkov@mail.ru)

Акулич Николай Васильевич — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией экологической физиологии УО «Могилевский государственный университет им. А.А. Кулешова» (212022, Республика Беларусь, г. Могилев, ул. Космонавтов, 1; тел.: 8 (10375222) 28-37-67; e-mail: akulichn@gmail.com)