

В. И. Коржов, А. Н. Алферов
МЕТАБОЛИЗМ СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР КЛЕТОК ПЕЧЕНИ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БРОНХО-ЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ
И ПРИМЕНЕНИИ ОМЕГА-3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Національний інститут фтизиатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського

Опыт использования омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (омега-3 ПНЖК) как в научных исследованиях, так и в клинической практике постоянно расширяется. Терапевтическая активность омега-3 ПНЖК неплохо изучена при сердечно-сосудистой патологии и в меньшей степени при бронхо-легочной [6]. Однако этих исследований явно недостаточно для того, чтобы расшифровать механизм благоприятного влияния на организм омега-3 ПНЖК. Исходя из этих предпосылок нами проведено изучение ряда жизненно важных метаболических процессов в биологических мембранах субклеточных структур печени и влияния на них омега-3 ПНЖК при экспериментальном бронхообструктивном синдроме.

Целью работы явилось изучение окислительного фосфорилирования в митохондриях и монооксигеназной системы микросом печени и влияния на эти системы омега-3 ПНЖК при экспериментальном бронхообструктивном синдроме с легким, средним и тяжелым течением.

Для работы использовали 180 половозрелых беспородных белых крыс одного пола и возраста массой 180–200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Животные были разделены на группы: интактные; получавшие омега-3 ПНЖК; сенсibilизированные; сенсibilизированные и получавшие омега-3 ПНЖК; с бронхообструктивным синдромом с легким, средним и тяжелым течением, с бронхообструктивным синдромом с легким, средним и тяжелым течением, получавших омега-3 ПНЖК с профилактической и лечебной целью.

Сенсibilизацию у крыс вызывали путем внутрибрюшинного введения через день в течение тридцати дней лиофилизированного кристаллического яичного овальбумина 99 % чистоты в концентрации 10 мкг в 0,5 мл стерильного физиологического раствора, содержащего 100 мг $Al(OH)_3$ [4]. Начиная с 30 дня эксперимента каждому сенсibilизированному животному через день в течение месяца проводили 10-минутные ингаляции аэрозоля овальбумина в провоцирующей дозе — 100 мкг овальбумина на 1 мл дистиллированной воды. Ингаляции проводили в специальной камере. При этом голова животного фиксируется и в нос поступает поток аэрозоля овальбумина из ультразвукового ингалятора.

Для получения бронхоспазма сенсibilизированных крыс ингалировали аэрозодем овальбумина в разрешающей дозе: 500 мкг овальбумина на 1 мл воды в течение 10 минут — для легкой степени тяжести; 1000 мкг овальбумина на 1 мл воды в течение 15 минут — для средней степени тяжести; 1500 мкг овальбумина на 1 мл воды в течение 25 минут — для тяжелой степени заболевания, после чего животных забивали [2].

Бронхообструктивный синдром с легким течением характеризовался появлением жидкого секрета в носу, слабым акроцианозом лапок, ушей и хвоста, одышкой,

учащением ритма дыхания, слабостью и заторможенностью движений.

Бронхообструктивный синдром со средним течением характеризовался снижением тонуса мышц конечностей, слабостью и заторможенностью движений, одышкой, учащением ритма дыхания, появлением жидкого секрета в носу; цвет носа, конечностей и хвоста становился синюшным, животные постоянно валились на бок, тяжело поднимались и с трудом передвигались.

Бронхообструктивный синдром с тяжелым течением характеризовался редкими неравномерными дыхательными движениями, появлением жидкого секрета в носу; цвет носа, конечностей и хвоста становился синюшным, резко снижался тонус мышц конечностей, животные валились на бок и не вставали, самостоятельно передвигаться не могли, 55 % животных погибли.

Омега-3 ПНЖК (препарат Эпадол с содержанием омега-3 ПНЖК не менее 43 %) в дозе 0,1 мл/кг массы тела вводили животным *per os* ежедневно в одно и то же время на протяжении одного месяца. Доза омега-3 ПНЖК была определена исходя из результатов изучения фармакокинетики омега-3 ПНЖК и соответствует среднетерапевтической дозе [3].

Объектом исследований были митохондрии и микросомы клеток печени. Крыс забивали декапитацией под кратковременным оглушающим эфирным наркозом, соблюдая правила работы с экспериментальными животными [9]. Печень отмывали от эритроцитов путём перфузии её холодной средой выделения (100 мл 0,25 М сахарозы и 0,01 М этилендиаминтетраацетата), гомогенизировали и методом дифференциального центрифугирования выделяли митохондрии [10] и микросомы [11]. Белок определяли спектрофотометрически по методу Лоури-Фолина [8].

Окислительное фосфорилирование в митохондриях печени изучали полярографическим методом с использованием вращающегося открытого платинового электрода [8]. Определяли основные параметры окислительного фосфорилирования по Чансу: V_2 — скорость дыхания после добавления субстрата (10 ммоль сукцината), V_3 — после добавления АДФ (200 мкмоль), V_4 — после исчерпания добавленного АДФ, V_f — скорость фосфорилирования, АДФ/О — коэффициент фосфорилирования.

О монооксигеназной системе судили по скорости потребления кислорода микросомами, определяемой полярографическим методом [1].

Полученные результаты исследований обрабатывались параметрическим методом вариационной статистики с применением *t*-критерия Стьюдента при использовании компьютерного пакета статистических прикладных программ "Excel" [5].

Вводимые в течение месяца интактным животным омега-3 ПНЖК не оказывали влияния на показатели окислительного фосфорилирования в митохондриях (табл. 1), на скорость поглощения кислорода микросома-

Таблиця 1

Влияние омега-3 ПНЖК на окислительное фосфорилирование (V_2, V_3, V_4 — мккатом O_2 /мин/мг белка; $V\phi$ — мкмоль АДФ /мин/мг белка; АДФ/О — коэффициент фосфорилирования) в митохондриях печени крыс с бронхообструктивным синдромом различной степени тяжести; $M \pm m$; $n = 8-9$

Группы животных	Исследуемые показатели				
	V_2	V_3	V_4	$V\phi$	АДФ/О
Интактные	0,009±0,001	0,034±0,002	0,008±0,001	0,060±0,002	1,91±0,02
Получавшие омега-3 ПНЖК	0,009±0,001	0,035±0,002	0,009±0,001	0,076±0,004	1,96±0,05
Сенситизированные	0,008±0,001	0,031±0,002	0,009±0,001	0,068±0,003	1,92±0,04
Сенситизированные и получавшие омега-3 ПНЖК	0,009±0,001	0,030±0,002	0,008±0,001	0,057±0,003	1,95±0,05
С БСЛ	0,008±0,001	0,023±0,002*	0,007±0,001	0,038±0,002*	1,51±0,04*
С БСЛ, получавшие омега-3 ПНЖК с ПЦ	0,008±0,001	0,024±0,002*	0,007±0,001	0,038±0,002*	1,55±0,05*
С БСЛ, получавшие омега-3 ПНЖК с ЛЦ	0,008±0,001	0,033±0,002#	0,007±0,001	0,061±0,004#	1,78±0,05#
С БСС	0,005±0,001*	0,021±0,001*	0,004±0,001*	0,033±0,003*	1,41±0,04*
С БСС, получавшие омега-3 ПНЖК с ПЦ	0,005±0,001*	0,024±0,002*	0,005±0,001*	0,040±0,002*	1,46±0,05*
С БСС, получавшие омега-3 ПНЖК с ЛЦ	0,007±0,001	0,035±0,002#	0,007±0,001	0,055±0,003#	1,70±0,05#
С БСТ	0,002±0,001*	0,012±0,002*	0,002±0,001*	0,017±0,003*	1,07±0,03*
С БСТ, получавшие омега-3 ПНЖК с ПЦ	0,002±0,001*	0,016±0,002*	0,002±0,001*	0,031±0,005*	1,24±0,06*
С БСТ, получавшие омега-3 ПНЖК с ЛЦ	0,002±0,001*	0,024±0,002*#	0,001±0,001*	0,047±0,003**	1,49±0,05**

Примечания: 1. БСЛ — бронхообструктивный синдром с легким течением; 2. БСС — бронхообструктивный синдром с средним течением; 3. БСТ — бронхообструктивный синдром с тяжелым течением; 4. ПЦ — профилактическая цель; 5. ЛЦ — лечебная цель; 6. * — разница показателей по отношению к интактным животным достоверна ($P < 0,01$); 7. # — разница показателей по отношению к животным с бронхообструктивным синдромом соответствующей степени тяжести достоверна ($P < 0,01$).

Таблиця 2

Влияние омега-3 ПНЖК на скорость окисления ($V O_2$) НАДН и НАДФН (в натом O_2 мин /мг белка) в микросомах печени животных с бронхообструктивным синдромом различной степени тяжести; $M \pm m$; $n = 8-9$

Группы животных	Исследуемые показатели			
	$V O_2$ без добавления НАДН	$V O_2$ с добавлением НАДН	$V O_2$ без добавления НАДФН	$V O_2$ с добавлением НАДФН
Интактные	3,15±0,10	6,11±0,15	3,17±0,10	9,49±0,21
Получавшие омега-3 ПНЖК	2,85±0,18	5,99±0,28	2,79±0,18	9,94±0,47
Сенситизированные	3,50±0,17	6,21±0,20	3,65±0,19	9,11±0,37
Сенситизированные и получавшие омега-3 ПНЖК	3,67±0,17	6,24±0,23	3,48±0,18	9,01±0,29
С БСЛ	3,26±0,18	6,17±0,27	3,06±0,16	9,04±0,41
С БСЛ, получавшие омега-3 ПНЖК с ПЦ	3,38±0,16	6,20±0,31	3,39±0,14	9,11±0,54
С БСЛ, получавшие омега-3 ПНЖК с ЛЦ	3,43±0,19	5,95±0,28	3,37±0,15	9,18±0,48
С БСС	2,15±0,11 *	3,83±0,21 *	2,20±0,15 *	4,84±0,28 *
С БСС, получавшие омега-3 ПНЖК с ПЦ	2,31±0,12 *	3,61±0,20 *	2,48±0,17 *	4,61±0,26 *
С БСС, получавшие омега-3 ПНЖК с ЛЦ	3,32±0,18 #	5,80±0,21 #	3,49±0,19 #	7,40±0,47 * #
С БСТ	1,42±0,14	2,60±0,18 *	1,38±0,13 *	3,111±0,27 *
С БСТ, получавшие омега-3 ПНЖК с ПЦ	*1,27±0,11	2,40±0,13 *	1,21±0,10 *	3,55±0,29 *
С БСТ, получавшие омега-3 ПНЖК с ЛЦ	*1,83±0,14 *	2,45±0,19 *	1,90±0,17 *	4,28±0,38 *

Примечания: 1. БСЛ — бронхообструктивный синдром с легким течением; 2. БСС — бронхообструктивный синдром с средним течением; 3. БСТ — бронхообструктивный синдром с тяжелым течением; 4. ПЦ — профилактическая цель; 5. ЛЦ — лечебная цель; 6. * — разница показателей по отношению к интактным животным достоверна ($P < 0,01$); 7. # — разница показателей по отношению к животным с бронхообструктивным синдромом соответствующей степени тяжести достоверна ($P < 0,01$).

ми как при свободном окислении (без НАДН и НАДФН), так и при НАДН- и НАДФН-зависимом дыхании (табл. 2).

Не выявлены изменения и у сенситизированных животных в показателях окислительного фосфорилирования в митохондриях, в показателях свободного и НАДН-

и НАДФН-зависимого окисления микросом. Аналогичная картина наблюдается также и у сенситизированных крыс и получавших омега-3 ПНЖК.

При бронхообструктивном синдроме с легким течением достоверно снижаются по отношению к интактным

животным скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии V_3 (на 32,3 %), скорость фосфорилирования (на 36,6 %), коэффициент АДФ/О (на 20,9 %) (табл. 1) В то же время, показатели монооксигеназной системы микросом не изменялись при бронхообструктивном синдроме легкой степени тяжести (рис. 2).

При бронхообструктивном синдроме с среднетяжелым течением происходит достоверное снижение по отношению к интактным животным всех изучаемых показателей в митохондриях и микросомах.

Бронхообструктивный синдром тяжелой формы характеризовался более существенными и глубокими изменениями всех изученных показателей в митохондриях и микросомах по отношению к бронхообструктивному синдрому средней степени тяжести. Так, если при бронхообструктивном синдроме средней степени тяжести коэффициент АДФ/О митохондрий снижался на 26,1 % по отношению к интактным животным, а скорость поглощения кислорода микросомами в присутствии НАДФН на 48,9 %, то при бронхообструктивном синдроме тяжелой формы эти показатели снижались на 43,9 % и 67,2 % соответственно. В монооксигеназной системе существенные снижения происходят при использовании микросомами в качестве доноров электронов НАДФН (на 48,9 % при средней степени тяжести, на 67,2 % при тяжелой), чем НАДН (на 37,3 % и 57,4 % соответственно).

Омега-3 ПНЖК при использовании их с профилактической целью не способствует нормализации изученных показателей окислительного фосфорилирования митохондрий и монооксигеназной системы микросом животных с легкой, средней и тяжелой степенью бронхообструктивного синдрома. В то же время, показатели окислительного фосфорилирования митохондрий и монооксигеназной системы микросом имели тенденцию к повышению своих значений. Уровень смертности животных у принимавших препарат был на 10 % ниже, чем у не принимавших и составлял 45 % (55 % у не леченных).

Применение омега-3 ПНЖК с лечебной целью приводит к достоверной нормализации в митохондриях по отношению к животным с бронхообструктивным синдромом легкой и средней степени тяжести показателей V_3 , V_f и АДФ/О. Происходит нормализация всех показателей и монооксигеназной системы микросом у животных с бронхообструктивным синдромом средней степени тяжести. У животных с тяжелым течением лечебное применение омега-3 ПНЖК приводит к достоверному повышению показателей V_f и АДФ/О, которые, однако, не достигают уровня контрольных величин. Положительное влияние лечебного применения омега-3 ПНЖК при бронхообструктивном синдроме с тяжелым течением подтверждается и уровнем смертности животных, который составил 40 %.

Таким образом, изложенные данные свидетельствуют, что при бронхообструктивном синдроме нарушаются функции систем энергообеспечения и детоксикации субклеточных структур печени. Наиболее выражены нарушения при тяжелой форме бронхообструктивного синдрома.

Применение омега-3 ПНЖК при бронхообструктивном синдроме способствует нормализации энергетического гомеостаза и системы биотрансформации эндогенных и экзогенных химических соединений. По-видимому, это один из возможных механизмов их благоприятного действия при патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — Москва: Наука, 1985. — 328 с.
2. Елисеєва Е. В., Кулакова Н. В., Невзорова В. А. Нитрооксидсинтаза эпителия бронхов и легких у крыс с моделью бронхиальной астмы // Бюллетень экспериментальной биол. и мед. — 2000. — Т. 130, № 8. — С. 176—180.
3. Морозова Н. А., Клименко М. Т., Гончар К. Е. Вивчення антимікробактеріальної дії препарату ТЕКОМ // Український пульмонологічний журнал. — 1998. — № 4. — С. 37—39.
4. Комплексная электронномикроскопическая оценка изменений ультраструктуры эпителия бронхиол при бронхиальной астме в эксперименте / А. К. Загорюлько, Т. А. Аскара, А. А. Загорюлько и др. // Український пульмонологічний журнал. — 2002. — № 2. — С. 51—53.
5. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel.- Киев: Морион. Издание 2 дополненное. — 2001. — 407 с.
6. Ноникова В. Е. Тактика лечения обострения бронхиальной астмы // Справочник поликлинического врача. — 2005. — № 1. — С. 60—64.
7. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / Под ред. Г. М. Франка, М. Н. Кондрашовой, Е. Н. Моховой и др. — Москва: Наука, 1973. — 280 с.
8. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот и др. // Москва: Мир, 1991. — 543 с.
9. Этика медико-биологического эксперимента в доклинических исследованиях / Г. П. Червонская, Г. П. Панкратова, Л. А. Миронова и др. // Токсикологический вестник. — 1998. — № 3. — С. 2—8.
10. Allfroy V. The isolation of subcellular components // Biochemistry, physiology, morphology. — 1969. — Vol. 11, № 7. — P. 254—255.
11. Silman N., Artman M., Engelderg H. Effect of magnesium and spermine on the aggregation of Bacterial and mammalian ribosomes // Biochimica et biophysica acta. — 1965. — № 103. — P. 231—240.

МЕТАБОЛИЗМ СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР КЛЕТОК ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БРОНХО-ЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ И ПРИМЕНЕНИИ ОМЕГА-3 ПОЛИЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

В. И. Коржов, А. Н. Алферов

Резюме

Полярографическим методом изучено действие омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (омега-3 ПНЖК, препарат Эпадол) на биоэнергетические функции митохондрий и монооксигеназную систему детоксикации микросом печени белых крыс с экспериментальным бронхообструктивным синдромом с легким, средним и тяжелым течением. Омега-3 ПНЖК способствуют реактивации функциональной активности митохондрий и микросом печени крыс, нарушенных при бронхообструктивном синдроме различной степени тяжести.

METABOLISM OF SUB-CELLULAR STRUCTURES OF A LIVER CELLS IN EXPERIMENTAL BRONCHO-PULMONARY PATHOLOGY AND APPLICATION OF OMEGA-3 OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

V. I. Korzhov, A. N. Alferov

Summary

Using the polarographic method we studied the effect of omega-3 of polyunsaturated fatty acids (omega-3 PUFA, Epadol) on bio-energy functions of mitochondrions and monooxygen system of detoxification of microsomas of a liver of white rats with experimental mild, moderate and severe bronchoobstructive syndrome. Omega-3 PUFA promoted reactivation of functional activity of mitochondrions and microsomas of a rat liver, acquired with broncho-obstructive syndrome of different intensity.