

В. И. Коржов, В. Н. Жадан, М. В. Коржов
ВЛИЯНИЕ ОМЕГА-3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ IN VITRO НА
АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ГЛУТАТИНОЗАВИСИМОЙ СИСТЕМЫ ДЕТОКСИКАЦИИ

Институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф. Г. Яновского АМН Украины

Ранее нами были получены данные, свидетельствующие о влиянии омега-3 ПНЖК на глутатинозависимую ферментную систему детоксикации при бронхо-лёгочной патологии. Однако механизм действия омега-3 ПНЖК на эту систему пока остаётся неясным.

В связи с этим, целью данного исследования явилось изучение влияния омега-3 ПНЖК in vitro на активность глутатинозависимых ферментов и содержание глутатиона в эритроцитах крови интактных животных и животных с различной экспериментальной бронхо-лёгочной патологией.

Объект и методы исследования

Исследования проведены на 60 белых беспородных крысах обоего пола массой 180–200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария.

Экспериментальный острый бронхит вызывали путём интратрахеального введения животным сефадекса А-25 [12]. Для создания экспериментальной модели хронического бронхита животным трансторакально в паренхиму лёгкого вводили спиртовой раствор туши, с последующим одноразовым введением через 20 дней взвеси куриных эритроцитов [4]. Экспериментальную модель пневмосклероза получали путём ингаляционного введения животным аэрозоля солянокислого гистамина. Трижды, с пятидневным интервалом, животных помещали в специальную воздушную камеру, через которую пропускали аэрозоль солянокислого гистамина (100 гамм в 0,3 мл 0,9 % раствора хлористого натрия) [10].

Животных декапитировали под эфирным наркозом.

Объектами исследования служили эритроциты крови.

В пробирки с гепарином набирали по 2,5 мл крови, добавляли препарат омега-3 ПНЖК в дозе 0,05 мл. Доза препарата была определена, исходя из результатов предыдущего изучения фармакокинетики омега-3 ПНЖК. Исследования проводили после периода часовой инкубации в термостате при температуре 37°C с периодическим встряхиванием каждые 15 мин [2, 8]. Эритроциты получали из стабилизированной раствором гепарина крови путём дифференциального центрифугирования.

Общую активность глутатионредуктазы (ГР) (КФ 1.6.4.2) изучали методом J. Carlberg в модификации В. П. Верболович и Л. М. Подгорной [1]. Принцип метода заключается в регистрировании скорости окисления NADPH при 340 нм. Общую активность глутатион-S-трансферазы (ГТ) (КФ 2.5.1.18) определяли по методу W. H. Habig [6]. Принцип метода основан на ферментативном связывании глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом с образованием — S-(2,4-динитрофенил)-глутатиона, имеющего максимум поглощения при длине волны 340 нм. Об активности глутатионпероксидазы (ГП) (КФ 1.11.1.9) судили по скорости окисления глутатиона в присутствии гидроперекиси третичного бутила [5]. Пробы фотометрировали при длине волны 412 нм.

Количество восстановленного и окисленного глутатиона определяли с использованием палладий-хлорпро-

мазинового комплекса по методике Lee Kum-Tatt в модификации В. Г. Чернышова [11].

Содержание гемоглобина в эритроцитах определяли гемиглобинцианидным унифицированным методом по стандартным наборам.

Статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Стьюдента [13].

Результаты и их обсуждение

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что после преинкубации крови интактных животных с омега-3 ПНЖК активности ГТ и ГР остались неизменными. В то же время активность ГП возросла более чем в 2 раза, а содержание восстановленного глутатиона почти в 1,5 раза уменьшилось. Аналогичные данные получены и после преинкубации гемолизата эритроцитов с омега-3 ПНЖК (табл. 1).

ГП находится в цитозоле эритроцитов. Её активация в гемолизате эритроцитов даёт основание думать о возможности непосредственного влияния омега-3 ПНЖК на этот фермент.

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что экзогенные омега-3 ПНЖК легко встраиваются в структуру различных фосфолипидов мембран форменных элементов крови, в частности, эритроцитов. Так, эйкозапентаеновая кислота включается в фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин, а докозагексаеновая кислота — в фосфатидилэтаноламин и триацилфосфаглицериды [3, 7, 9]. Таким образом, омега-3 ПНЖК, по-видимому, могут оказывать влияние на активность ГП в негемолизированных эритроцитах.

Учитывая, что омега-3 ПНЖК являются субстратом для ПОЛ, они в определённой степени могут усиливать этот процесс и, как следствие этого, вызывать усиление активности ферментов антиоксидантной защиты. Однако увеличение в течение 1 часа активности ГП под влиянием омега-3 ПНЖК более чем в 2 раза, трудно объяснить только ответной реакцией на усиление ПОЛ. Подтверждением этого могут служить и ранее полученные нами данные о том, что введение интактным животным в течение месяца омега-3 ПНЖК не сопровождается увеличением продуктов ПОЛ в эритроцитах.

При остром и хроническом бронхите, пневмосклерозе в эритроцитах крови наблюдаются те же закономерности изменений, что и в инкубированных с омега-3 ПНЖК эритроцитах интактных животных — возрастание активности ГП при снижении восстановленного глутатиона (табл. 2, 3, 4). В большей степени эти изменения выражены при пневмосклерозе. Преинкубация с омега-3 ПНЖК эритроцитов от животных с острым и хроническим бронхитом существенно не сказалась на активности ГП. В эритроцитах от крыс с пневмосклерозом она понизилась на 40 %. Следует отметить, что в этих условиях омега-3 ПНЖК не оказывают существенного влияния на содержание восстановленного глутатиона.

Таким образом, результаты проведенных in vitro исследований свидетельствуют, что омега-3 ПНЖК оказывают различное влияние на активность глутатинозависимых

Таблиця 1

Активність глутатинозависимих ферментів і кількість глутатиона в еритроцитах крові інтактних тварин при впливі омега-3 ПНЖК in vitro (M±m)

Умовля опыта	Исследуемые показатели					
	Глутатион-пероксидаза, мкмоль/мин г Нб	Глутатион-редуктаза, мкмоль/мин г Нб	Глутатион-трансфераза, мкмоль/мин г Нб	Глутатион-восстановленный, ммоль/л Ег	Глутатион-окисленный, ммоль/л Ег	Глутатион-общий, ммоль/л Ег
Контроль n=10	172,6±19,5	1,88±0,14	2,25±0,10	2,46±0,12	0,30±0,05	2,76±0,13
Омега - 3 ПНЖК, цельная кровь n=8	363,8±24,6*	2,00±0,13	2,23±0,10	1,70±0,09	0,34±0,05	2,17±0,11*
Омега - 3 ПНЖК, гемолизат Эритроцитов n=10	394,44±52,6*	1,56±0,14	1,74±0,23	—	—	—

Примечание: * — различия по сравнению с контролем достоверны (P<0,05)

Таблиця 2

Активність глутатинозависимих ферментів і кількість глутатиона в еритроцитах крові тваринних с експериментальним острым бронхитом при впливі омега-3 ПНЖК in vitro (M±m)

Умовля опыта	Исследуемые показатели					
	Глутатион-пероксидаза, мкмоль/мин г Нб	Глутатион-редуктаза, мкмоль/мин г Нб	Глутатион-трансфераза, мкмоль/мин г Нб	Глутатион-восстановленный, ммоль/л Ег	Глутатион-окисленный, ммоль/л Ег	Глутатион-общий, ммоль/л Ег
Контроль n=10	172,6±19,5	1,88±0,14	2,25±0,10	2,46±0,12	0,30±0,05	2,76±0,13
Острый бронхит n=6	346,3±34,4*	1,84±0,12	2,32±0,11	2,22±0,10	0,22±0,03	2,46±0,13
Омега - 3 ПНЖК n=8	363,82±24,6*	2,00±0,13	2,23±0,10	1,70±0,09	0,34±0,05	2,17±0,11*
Омега - 3 ПНЖК+острый бронхит n=10	358,1±15,1*	2,07±0,07	2,22±0,06	1,35±0,17*	0,53±0,10*	1,47±0,11*

Примечание: * — различия по сравнению с контролем достоверны (P<0,05)

Таблиця 3

Активність глутатинозависимих ферментів і кількість глутатиона в еритроцитах крові тваринних с експериментальним хроническим бронхитом при впливі омега-3 ПНЖК in vitro (M±m)

Умовля опыта	Исследуемые показатели					
	Глутатион-пероксидаза, мкмоль/мин г Нб	Глутатион-редуктаза, мкмоль/мин г Нб	Глутатион-трансфераза, мкмоль/мин г Нб	Глутатион-восстановленный, ммоль/л Ег	Глутатион-окисленный, ммоль/л Ег	Глутатион-общий, ммоль/л Ег
Контроль n=10	172,6±19,5	1,88±0,14	2,25±0,10	2,46±0,12	0,30±0,05	2,76±0,13
Хронич. бронхит n=6	387,7±33,1*	1,69±0,03	2,19±0,10	1,83±0,07*	0,28±0,06	2,14±0,07*
Омега - 3 ПНЖК n=8	363,8±24,6*	2,00±0,13	2,23±0,10	1,70±0,09	0,34±0,05	2,17±0,11*
Омега - 3 ПНЖК+хронический бронхит n=10	398,6±58,8*	1,86±0,09	1,75±0,13	1,68±0,13*	0,47±0,07*	2,42±0,35

Примечание: * — различия по сравнению с контролем достоверны (P<0,05)

Таблиця 4

Активність глутатинозависимих ферментів і кількість глутатиона в еритроцитах крові тваринних с експериментальним пневмосклерозом при впливі омега-3 ПНЖК in vitro (M±m)

Умовля опыта	Исследуемые показатели					
	Глутатион-пероксидаза, мкмоль/мин г Нб	Глутатион-редуктаза, мкмоль/мин г Нб	Глутатион-трансфераза, мкмоль/мин г Нб	Глутатион-восстановленный, ммоль/л Ег	Глутатион-окисленный, ммоль/л Ег	Глутатион-общий, ммоль/л Ег
Контроль n=10	172,6±19,5	1,88±0,14	2,25±0,10	2,46±0,12	0,30±0,05	2,76±0,13
Пневмосклероз n=6	525,4±23,0*	2,25±0,22	2,57±0,14	1,51±0,09*	0,38±0,04	1,71±0,12*
Омега - 3 ПНЖК n=8	363,8±24,6*	2,00±0,13	2,23±0,10	1,70±0,09	0,34±0,05	2,17±0,11*
Омега - 3 ПНЖК+пневмосклероз n=10	315,4±17,2*	2,77±0,19	3,05±0,16	1,34±0,10*	0,39±0,04	1,79±0,10*

Примечание: * — различия по сравнению с контролем достоверны (P<0,05)

ферментов при изученных патологических состояниях. Существенного влияния омега-3 ПНЖК на ГТ и ГР не выявлено. В то же время наблюдается активация ГП, являющаяся, вероятнее всего, компенсаторной реакцией на возрастные продукты ПОЛ. Представляет интерес и тот факт, что в интактных эритроцитах омега-3 ПНЖК активирует ГП. Однако в условиях патологии, когда ферментная система и без того находится в напряжении, возрастания активности ГП под влиянием омега-3 ПНЖК не происходит.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Верболович В. П., Подгорная Л. М.* Определение активности глутатионредуктазы и супероксиддисмутазы на биохимическом автоанализаторе // Лаб. дело — 1987. — № 2. — С. — 17–20.
2. *Влияние диеты, обогащённой омега-3 ПНЖК, на жирнокислотный состав, липиды и липопротеиды крови у больных ишемической болезнью сердца / М. В. Пыж, Н. А. Грацианский, Г. П. Арешев и др. // Кардиология. — 1993. — № 5. — С. 21–26.*
3. *Влияние полиненасыщенных жирных кислот ω -3 класса на системы свёртывания крови и фибринолиза больных сахарным диабетом типа 2 / Панченко В. М., Карабасова М. А., Лютова Л. В. и др. // Клиническая медицина. — 2002. — № 2 — С. 23–27.*
4. *Моделирование хронического неспецифического заболевания лёгких и гипертензии малого круга кровообращения на лабораторных животных / Яценко В. П., Блонская Л. Ф., Колесова Н. А. и др. // Укр. пульмонолог. журнал. — 1998. — № 3. — С. 62–66.*
5. *Моин В. М.* Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. — 1986. — № 12. — С. 724–727.
6. *Переслягина И. А.* Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // Лаб. дело. — 1989. — № 11. — С. 20–22.
7. *Путинцева Н. В.* Клиническая эффективность омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в лечении больных хроническим обструктивным бронхитом, сочетанным с ишемической болезнью сердца // Укр. пульмонолог. журнал. — 2003. — № 3. — С. 40–44.
8. *Пыж М. В., Грацианский Н. А., Голубых В. Н.* Пищевая добавка, содержащая омега-3 ПНЖК, предупреждает экспериментальную тромботическую окклюзию коронарных артерий у собак // Кардиология. — 1993. — № 2. — С. 41–46.
9. *Титов В. Н.* Биологическое обоснование применения полиненасыщенных жирных кислот семейства ω -3 в профилактике атеросклероза // Вопросы питания. — 1999. — №3. — С. 34–41.
10. *Успенский В. И.* Экспериментальный гистаминовый пневмосклероз // Архив патологии. — 1962. — № 4. — С. 46–55.
11. *Чернышов В. Г.* Определение восстановленного и окисленного глутатиона в эритроцитах беременных женщин // Лаб. дело. — 1983. — № 3. — С. 31–33.
12. *Экспериментальная модель неинфекционного гранулематоза лёгких / Макарова О. В., Ковалёва В. Л., Сладкопцев А. С. и др. // Пульмонология. — 1996. — № 1. — С. 76–79.*
13. *Юнкеров В. И., Григорьев С. Г.* Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований — Санкт-Петербург: Военно-медицинская Академия, 2002. — 266 с.

ВЛИЯНИЕ ОМЕГА-3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ IN VITRO НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ГЛУТАТИОНОЗАВИСИМОЙ СИСТЕМЫ ДЕТОКСИКАЦИИ

В. И. Коржов, В. Н. Жадан, М. В. Коржов

Резюме

Изучено влияние омега-3 ПНЖК in vitro на активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы, содержание восстановленного, окисленного и общего глутатиона в эритроцитах крови интактных животных и животных с моделированными острым, хроническим бронхитом, пневмосклерозом. Полученные данные свидетельствуют об определённых изменениях в глутатионзависимой ферментной системе в эритроцитах крови интактных животных после инкубации с омега-3 ПНЖК. Те же закономерности изменений в ферментной системе глутатиона наблюдаются и в эритроцитах крови животных с экспериментальным острым, хроническим бронхитом и пневмосклерозом.

THE INFLUENCE OF OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN VITRO ON ACTIVITY OF THE ENZYMES OF GLUTATION-DEPENDENT DETOXICATION SYSTEM

V. I. Korzhov, V. N. Zhadan, M. V. Korzhov

Summary

We have studied influence of omega-3 polyunsaturated fatty acids in vitro on activity glutationperoxidase, glutationreductase, glutationtransferase, and the content of reduced, oxidated and total glutation in erythrocytes of healthy animals and animals with induced acute, chronic bronchitis and pneumofibrosis. Certain changes in enzymes of glutation-dependent system of erythrocytes, incubated with omega-3 polyunsaturated fatty acids, of healthy animals were detected. Same peculiarities in enzymes of glutation-dependent system of erythrocytes were observed in animals with experimental acute, chronic bronchitis and pneumofibrosis.