

© В.И. Коржов, А.Н. Алфёров (20 октября 2005). Окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс при бронхообструктивном синдроме средней степени тяжести и введении омега-3 полиненасыщенных жирных кислот [FTP архив]. URL <ftp://ftp1.ifp.kiev.ua/original/2005/korzhov2005.pdf>

УДК: 616.233-002-092.6/9:547.540.586.2

В.И. Коржов, А.Н. Алфёров

Окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс при
бронхообструктивном синдроме средней степени тяжести и введении омега-3
полиненасыщенных жирных кислот

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

Возникающее в организме больных с бронхообструктивным синдромом состояние гипоксии приводит к изменению функций полиферментных систем биологических мембран [8, 9]. Однако, до настоящего времени вопрос о состоянии этих систем в митохондриях печени при бронхообструктивном синдроме в литературе недостаточно освещен. Мало изучено также и влияние омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (омега-3 ПНЖК) на эти процессы при данной патологии.

Целью настоящей работы явилось изучение окислительного фосфорилирования в митохондриях печени и влияние на него омега-3 ПНЖК при экспериментальном бронхообструктивном синдроме средней степени тяжести.

В работе были использованы 85 половозрелых беспородных белых крыс массой 180-200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Животные были разделены на несколько групп: интактные; получавшие омега-3 ПНЖК; сенсibilизированные; сенсibilизированные и получавшие омега-3 ПНЖК; с бронхообструктивным синдромом средней степени тяжести; с бронхообструктивным синдромом средней степени тяжести, получавших, омега-3 ПНЖК с профилактической и лечебной целью.

Экспериментальный бронхообструктивный синдром средней степени тяжести у крыс вызывали путем внутрибрюшинного введения через день (в течение двадцати дней) лиофилизированного кристаллического яичного овальбумина 99 % чистоты в концентрации 10 мкг в 0,5 мл стерильного физиологического раствора, содержащего 100 мг $Al(OH)_3$ [3]. Начиная с 30 дня эксперимента каждому сенсibilизированному животному через день в течение месяца проводили 10 минутные ингаляции аэрозоля овальбумина в провоцирующей дозе – 100 мкг 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. На животное за время одного сеанса ингаляции в среднем расходуется 10 мл раствора овальбумина.

Для получения бронхоспазма сенсibilизированным и проингалированными крысам давали разрешающую дозу овальбумина – 1000 мкг на 1 мл воды в течение 15 минут. Ингаляции овальбумина в разрешающей дозе проводили по одному сеансу 2 дня подряд, после чего животных забивали [2].

Бронхообструктивный синдром средней степени тяжести у крыс 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.

Омега-3 ПНЖК (препарат “ЭПАДОЛ” с содержанием омега-3 ПНЖК не менее 45 %) в дозе 0,1 мл/кг массы тела вводили животным рег-ос ежедневно в одно и тоже время на протяжении одного месяца.

После ингаляции животных овальбумином в разрешающей дозе, соблюдая правила работы с экспериментальными животными [5], крыс забивали декапитацией под кратковременным оглушающим эфирным наркозом. Митохондрии печени получали методом дифференциального центрифугирования [7] в ледяной среде выделения (0,25 М сахарозы, 0,01 М этилендиаминтетраацетата). Белок определяли спектрофотометрически по методу Лоури-Фолина [1].

Окислительное фосфорилирование в митохондриях печени изучали полярографическим методом [4]. Определяли основные параметры окислительного фосфорилирования по Чансу: V_2 – скорость дыхания после добавления субстрата (10 ммоль сукцината или 10 ммоль α -кетоглутарата), V_3 – после добавления АДФ (200 мкмоль), V_4 – после исчерпания добавленного АДФ, $V_{днф}$ – после добавления ДНФ (200 мкмоль), $V_{ф}$ – скорость фосфорилирования, ДК – коэффициент дыхательного контроля и коэффициент АДФ/О.

Полученные результаты исследований подлежали закону нормального распределения вариационного ряда и обрабатывались параметрическим методом вариационной статистики с применением t-критерия Стьюдента при использовании компьютерного пакета статистических прикладных программ “Excel” [6].

Вводимый в течение месяца интактным животным омега-3 ПНЖК не оказывает существенного влияния на показатели окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крыс при использовании в качестве субстрата окисления как сукцината, так и α -кетоглутарата.

Не выявлены изменения и у сенсibilизированных животных при окислении сукцината (табл. 1), и α -кетоглутарата (табл. 2), а также у сенсibilизированных крыс и получавших омега-3 ПНЖК (табл. 1 и 2).

При бронхообструктивном синдроме средней степени тяжести при окислении сукцината достоверно снижаются по отношению к показателям интактных животных скорости потребления кислорода митохондриями в состоянии V_2 (на 44,4 %), V_3 (на 34,3 %), V_4 (на 50,0 %), снижается скорость фосфорилирования (на 45,0 %), коэффициент фосфорилирования (на 26,1 %) (табл. 1). В то же время скорость разобщенного дыхания и дыхательный контроль остаются в пределах нормы.

Применение омега-3 ПНЖК с профилактической целью не приводит к достоверной нормализации сниженных показателей окислительного фосфорилирования в митохондриях, хотя и наблюдается тенденция к их восстановлению.

Применение омега-3 ПНЖК с лечебной целью способствует нормализации скорости потребления кислорода в состоянии V_3 , скорости фосфорилирования, коэффициента фосфорилирования.

Аналогичная картина наблюдается при окислении митохондриями α -кетоглутарата (табл. 2). Скорость потребления кислорода в состоянии V_3 и $V_{\text{днф}}$ не изменяется, но при этом достоверно снижается по отношению к показателям интактных животных скорость дыхания в состоянии V_2 (на 33,3 %) и V_4 (на 33,4 %), скорость фосфорилирования (на 35,8 %, коэффициент фосфорилирования (на 27,5 %).

При применении омега-3 ПНЖК с профилактической целью наблюдается тенденция к нормализации сниженных показателей окислительного фосфорилирования.

При использовании омега-3 ПНЖК с лечебной целью достоверно нормализуются скорость поглощения кислорода митохондриями в состоянии V_3 , скорость фосфорилирования $V_{\text{ф}}$ и коэффициент фосфорилирования АДФ/О.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют, что при экспериментальном бронхообструктивном синдроме средней степени тяжести происходит нарушение функционального состояния электронтранспортной цепи митохондрий печени при использовании в качестве субстрата окисления как сукцината, так и α -кетоглутарата.

Омега-3 ПНЖК способствуют нормализации нарушенного окислительного фосфорилирования в митохондриях печени. ричем, препарат наиболее эффективен при применении его с лечебной целью, менее эффективен при применении его с профилактической целью.

Таблица 1 – Влияние омега-3 ПНЖК на окислительное фосфорилирование в митохондриях печени животных (V_2 , V_3 , V_4 , $V_{днф}$ - в мккатом O_2 /мин/мг белка; $Vф$ – в мкмоль АДФ /мин/мг белка; ДК, АДФ/О – коэффициенты; субстрат фосфорилирования – АДФ, окисления – сукцинат; $M \pm m$)

Показатели	Группы животных					
	интактные n = 27	сенсibili- зированные n = 8	сенсibili- зированные и получавшие омега-3 ПНЖК n = 8	животные с бронхообструктивным синдромом средней степени тяжести		
				не получавшие омега-3 ПНЖК n = 9	получавшие омега-3 ПНЖК с профилакти- ческой целью n = 9	получавшие омега-3 ПНЖК с лечебной целью n = 9
V_2	0,009±0,001	0,008±0,001	0,009±0,001	0,005±0,001*	0,005±0,001*	0,007±0,001
V_3	0,032±0,001	0,031±0,002	0,030±0,002	0,021±0,001*	0,024±0,002*	0,035±0,002#
V_4	0,008±0,001	0,009±0,001	0,008±0,001	0,004±0,001*	0,005±0,001*	0,007±0,001
$V_{днф}$	0,030±0,001	0,027±0,002	0,026±0,002	0,026±0,002	0,028±0,002	0,026±0,002
$Vф$	0,060±0,002	0,068±0,003	0,057±0,003	0,033±0,002*	0,040±0,002*	0,055±0,003#
АДФ/О	1,910±0,021	1,920±0,036	1,950±0,040	1,410±0,039*	1,460±0,044*	1,700±0,050#
ДК	3,85±0,09	3,86±0,18	3,57±0,20	4,20±0,14	4,10±0,17	4,40±0,27

Примечание:

- 1) * - разница показателей по отношению к интактным животным достоверна ($P < 0,01$);
- 2) # - разница показателей по отношению к животным с бронхообструктивным синдромом достоверна ($P < 0,01$).

Таблица 2 – Влияние омега-3 ПНЖК на окислительное фосфорилирование в митохондриях печени животных (V_2 , V_3 , V_4 , $V_{днф}$ - в мккатом O_2 /мин/мг белка; $V_{ф}$ – в мкмоль АДФ /мин/мг белка; ДК, АДФ/О – коэффициенты; субстрат фосфорилирования – АДФ, окисления – α -кетоглутарат; $M \pm m$)

Показатели	Группы животных					
	интактные n = 27	сенсibili- зированные n = 8	сенсibili- зированные и получавшие омега-3 ПНЖК n = 8	животные с бронхообструктивным синдромом средней степени тяжести		
				не получавшие омега-3 ПНЖК n = 9	получавшие омега-3 ПНЖК с профилакти- ческой целью n = 9	получавшие омега-3 ПНЖК с лечебной целью n = 9
V_2	0,009±0,001	0,008±0,001	0,008±0,001	0,005±0,001*	0,006±0,001*	0,008±0,001
V_3	0,039±0,002	0,032±0,002	0,040±0,003	0,028±0,001*	0,033±0,002	0,037±0,002#
V_4	0,009±0,001	0,008±0,001	0,009±0,001	0,005±0,001*	0,006±0,001*	0,007±0,001
$V_{днф}$	0,030±0,001	0,021±0,002	0,026±0,002	0,020±0,002	0,021±0,002	0,035±0,002
$V_{ф}$	0,078±0,002	0,066±0,003	0,065±0,004	0,048±0,003*	0,050±0,003*	0,063±0,004#
АДФ/О	2,800±0,020	2,710±0,038	2,720±0,036	1,970±0,033*	2,030±0,034*	2,560±0,040#
ДК	4,01±0,10	4,26±0,24	4,07±0,21	4,40±0,27	4,50±0,31	4,80±0,33

Примечание:

- 1) * - разница показателей по отношению к интактным животным достоверна ($P < 0,01$);
- 2) # - разница показателей по отношению к животным с бронхообструктивным синдромом достоверна ($P < 0,01$).

Литература

1. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. Справочник биохимика: Справочник / Под ред. О.А. Реутова. - Перевод В.Л. Друцы, О.Н. Королёвой. - 3-е издание доп. и переработ. - Москва: Мир, 1991. – 543 с.
2. Елисеева 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. Комплексная электронномикроскопическая оценка изменений ультраструктуры эпителия бронхиол при бронхиальной астме в эксперименте / А.К. Загоруйко, Т.А. Аскара, А.А. Загоруйко и др. //Український пульмонологічний журнал. – 2002. - № 2. – С. 51 – 53.
4. 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.
5. Червонская Г.П., Панкратова Г.П. Этика медико-биологического эксперимента в доклинических исследованиях // Токсикологический вестник. – 1998. – № 3. – С. 2 – 8.
6. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. – Санкт-Петербург: Военно-медицинская Академия, 2002. – 266 с.
7. Allfroy V. The isolation of subzellular components // Biochemistry, physiology, morfology. - 1969. – Vol. 11, № 7. – P. 254 – 255.
8. Caramori G., Pari A. Oxidants and astma // Thorax. – 2004. – № 59 (2). – P. 170 – 177.
9. Outcome evaluatuion of early – discharge from hospital with astma / S.R. Khan, R.L. Henri, T. P. Hurst et all. // Respirology. – 2003. – № 1. – P. 77 – 81.