

© В.И. Коржов, А.Н. Алферов (6 ноября 2006). Экспериментальное изучение функции печени при бронхообструктивном синдроме [FTP архив]. URL <ftp://ftp1.ifp.kiev.ua/original/2006/korzhov2006.pdf>

УДК: 616.233-002-092.6/9:576.347:581.001.5

В.И. Коржов, А.Н. Алферов

Экспериментальное изучение функции печени при бронхообструктивном синдроме

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

Настоящее исследование было предпринято с целью изучения функционального состояния печени при тяжелой форме бронхообструктивного синдрома (БС).

Учитывая, что в механизме нарушения функции печени при БС важное место имеет ослабление интенсивности энергопродукции митохондриями, мы попытались выяснить насколько оно выражено при бронхообструкции с тяжелыми клиническими проявлениями.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение окислительного фосфорилирования в митохондриях печени при тяжелой форме БС и возможности коррекции нарушения энергетического гомеостаза омега-3 полиненасыщенными жирными кислотами (омега-3 ПНЖК).

Работа проведена на 80 половозрелых беспородных белых крысах 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 БС; с БС, получавших омега-3 ПНЖК с профилактической и лечебной целью.

Экспериментальный БС у крыс вызывали путем внутрибрюшинного введения через день в течение 30 дней лиофилизированного кристаллического яичного овальбумина 99 % чистоты в концентрации 10 мкг в 0,5 мл стерильного физиологического раствора, содержащего 100 мг $Al(OH)_3$ [2]. 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

провоцирующей дозой овальбумина крысам давали разрешающую дозу овальбумина – 1500 мкг на 1 мл воды в течение 25 минут, после чего животных забивали [1].

БС у крыс характеризовался редкими неравномерными дыхательными движениями, учащением ритма дыхания, появлением жидкого секрета в носу, цвет носа, ушей, конечностей и хвоста становился синюшным, резко снижался тонус мышц конечностей, животные валялись 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 на протяжении одного месяца.

Объектом исследования служили митохондрии клеток печени. Забор биологического материала для исследований проводили при строгом соблюдении правил работы с экспериментальными животными [6]. Крыс забивали декапитацией под кратковременным оглушающим эфирным наркозом. Печень отмывали от эритроцитов путём перфузии её холодной средой выделения (0,25 М сахарозы и 0,01 М версена), гомогенизировали при 0 °С и методом дифференциального центрифугирования выделяли митохондрии [7]. Белок определяли спектрофотометрическим методом [5].

Оценку функционального состояния митохондрий проводили после добавления в среду инкубации 10 ммоль сукцината или α -кетоглутарата (V_2), 200 мкмоль АДФ (V_3), в состоянии покоя (V_4), в присутствии 200 мкмоль разобщителя 2,4-динитрофенола ($V_{днф}$). При этом учитывалась скорость фосфорилирования ($V_{ф}$) [4].

Полученные результаты исследований обрабатывались методом вариационной статистики с применением *t*-критерия Стьюдента при использовании компьютерного пакета статистических прикладных программ "Excel" [3].

Результаты проведенных экспериментов показали, что экзогенные омега-3 ПНЖК при введении их в течение месяца интактным животным не влияют на процесс окислительного фосфорилирования (табл.1 и табл. 2).

Не было выявлено каких-либо изменений в изученной функции дыхательной цепи и у sensibilizированных овальбумином животных, не получавших и получавших омега-3 ПНЖК.

При БС значительно нарушается энергетический обмен в митохондриях. При этом скорость окисления сукцината снижается на 78 %, скорость фосфорилирующего дыхания – на 65 %, скорость дыхания в состоянии 4 (по Чансу) – на 75 %, разобщенного дыхания – на 14 %, скорость фосфорилирования – на 49 % и величина коэффициента фосфорилирования –

на 44 %.

Применение омега-3 ПНЖК с профилактической целью способствовало увеличению скорости фосфорилирования, однако она осталась ниже контрольной величины. Все остальные показатели окислительного фосфорилирования не изменились.

При использовании омега-3 ПНЖК с лечебной целью влияния препарата более выражено, чем при применении его с целью профилактики. По сравнению с животными, не получавшими омега-3 ПНЖК, значительно увеличивается скорость фосфорилирующего дыхания и величина коэффициента фосфорилирования.

Довольно существенными являются изменения функции дыхательной цепи и при использовании в качестве субстрата окисления α -кетоглутарата. Направленность изменений здесь аналогична той, что и при использовании сукцината, однако степень нарушений (V_4 , V_f , коэффициент АДФ/О) более выражена.

Необходимо отметить, что влияния омега-3 ПНЖК, применявшихся с профилактической и лечебной целью при бронхообструктивном заболевании с тяжелым течением на функциональное состояние митохондрий печени, не было выявлено.

Ранее нами было показано, что нарушение энергетического гомеостаза в митохондриях печени происходит при легкой и средней формах БС. С учетом полученных данных можно говорить, что в патогенезе БС важную роль играет нарушение регуляции митохондриальных процессов, в частности, в печени, наиболее выраженное при тяжелой форме бронхообструкции.

Следует также отметить, что при данном патологическом состоянии более чувствительным к нарушениям является участок дыхательной цепи до убихинона (субстрат окисления α -кетоглутарат).

Результаты этих исследований показали, что даже при тяжелой форме БС возможна определенная коррекция отклонений рассмотренных митохондриальных функций.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. 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.
3. 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.

4. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / Под ред. Г.М. Франка, М.Н. Кондрашовой, Е.Н. Моховой и др. – М.: Наука, 1973. – 280 с.

5. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот и др. // Москва: Мир, 1991. – 543 с.

6. 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.

7. Allfroy V. The isolation of subzellular components // Biochemistry, physiology, morfology. – 1969. – Vol. 11, № 7. – P. 254 – 255.

Таблица 1 - Влияние омега-3 ПНЖК на окислительное фосфорилирование в митохондриях печени животных с бронхообструктивным синдромом тяжелой степени тяжести ($V_2, V_3, V_4, V_{днф}$ – мктом O_2 /мин/мг белка; $V_{ф}$ – мкмоль АДФ /мин/мг белка; АДФ/О – коэффициент фосфорилирования; субстрат – сукцинат, $M \pm m$)

Показатели	Группы животных						
	Интактные n = 27	Интактные и получавшие омега-3 ПНЖК n = 9	Сенсибилизированные n = 8	Сенсибилизированные и получавшие омега-3 ПНЖК n = 8	Животные с бронхообструктивным синдромом тяжелой степени тяжести		
					не получавшие омега-3 ПНЖК n = 9	получавшие омега-3 ПНЖК с профилактической целью n = 9	получавшие омега-3 ПНЖК с лечебной целью n = 9
V_2	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,002 ± 0,001 *	0,002 ± 0,001 *	0,002 ± 0,001 *
V_3	0,034 ± 0,002	0,035 ± 0,002	0,031 ± 0,002	0,030 ± 0,002	0,012 ± 0,002 *	0,016 ± 0,002 *	0,024 ± 0,002 *#
V_4	0,008 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,002 ± 0,001 *	0,002 ± 0,001 *	0,001 ± 0,001 *
$V_{днф}$	0,030 ± 0,002	0,043 ± 0,004	0,027 ± 0,002	0,026 ± 0,002	0,013 ± 0,002 *	0,013 ± 0,003 *	0,018 ± 0,002 *
$V_{ф}$	0,060 ± 0,002	0,076 ± 0,004	0,068 ± 0,003	0,057 ± 0,003	0,017 ± 0,003 *	0,031 ± 0,005 *	0,047 ± 0,003 *#
АДФ/О	1,910 ± 0,021	1,960 ± 0,043	1,920 ± 0,036	1,950 ± 0,050	1,070 ± 0,021 *	1,240 ± 0,063 *	1,490 ± 0,044 *#
ДК	3,85 ± 0,10	3,49 ± 0,27	3,86 ± 0,28	3,57 ± 0,21	7,87 ± 0,68 *	7,28 ± 0,59 *	7,01 ± 0,50 *

Примечания:

- 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 с бронхообструктивным синдромом тяжелой степени тяжести ($V_2, V_3, V_4, V_{днф}$ – мккатом O_2 /мин/мг белка; $V_{ф}$ – мкмоль АДФ /мин/мг белка; АДФ/О – коэффициент фосфорилирования; субстрат – α -кетоглютарат, $M \pm m$)

Показатели	Группы животных						
	Интактные n = 25	Интактные и получавшие омега-3 ПНЖК n = 9	Сенсибилизированные n = 8	Сенсибилизированные и получавшие омега-3 ПНЖК n = 8	Животные с бронхообструктивным синдромом тяжелой степени тяжести		
					не получавшие омега-3 ПНЖК n = 9	получавшие омега-3 ПНЖК с профилактической целью n = 9	получавшие омега-3 ПНЖК с лечебной целью n = 9
V_2	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,002 ± 0,001 *	0,002 ± 0,001 *	0,002 ± 0,001 *
V_3	0,040 ± 0,002	0,040 ± 0,004	0,032 ± 0,003	0,040 ± 0,005	0,018 ± 0,002 *	0,020 ± 0,002 *	0,028 ± 0,003 *
V_4	0,009 ± 0,001	0,010 ± 0,002	0,008 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,002 ± 0,001 *	0,002 ± 0,001 *	0,002 ± 0,001 *
$V_{днф}$	0,030 ± 0,002	0,032 ± 0,003	0,021 ± 0,002	0,026 ± 0,003	0,013 ± 0,002 *	0,014 ± 0,002 *	0,018 ± 0,002 *
$V_{ф}$	0,078 ± 0,003	0,077 ± 0,005	0,066 ± 0,004	0,065 ± 0,004	0,023 ± 0,004 *	0,025 ± 0,004 *	0,032 ± 0,004 *
АДФ/О	2,800 ± 0,031	2,730 ± 0,050	2,710 ± 0,048	2,720 ± 0,046	1,230 ± 0,062 *	1,27 ± 0,066 *	1,43 ± 0,087 *
ДК	4,01 ± 0,12	3,23 ± 0,19	4,26 ± 0,24	4,07 ± 0,21	7,03 ± 0,55 *	7,23 ± 0,47 *	7,46 ± 0,56 *

Примечание: * – разница показателей по отношению к интактным животным достоверна ($P < 0,01$).