

УДК 577.125:591.436

©Коллектив авторов

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ СЕРДЦА КРЫС В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫМИ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ

О.В. Кеца, И.А. Шмараков, М.М. Марченко*

Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича,
58012 Украина, Черновцы, ул. Коцюбинского, 2; тел.: 8(0372)58-48-38; эл. почта: ketsa80@mail.ru

Исследовали содержания первичных (диеновых конъюгатов, ДК; триеновых конъюгатов, ТК), вторичных (кетодиенов, КД; сопряжённых триенов, СТ; ТБК-активных продуктов) и конечных (шиффовых оснований) продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), а также уровня генерации супероксидного радикала в митохондриальной фракции сердца крыс в условиях различного обеспечения животных полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК) семейств ω -6 и ω -3. В митохондриальной фракции сердца крыс, содержащихся на диете с высоким содержанием ω -6 и ω -3 ПНЖК в течение восьми недель, обнаружено увеличение первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ и скорости образования супероксидного радикала. При использовании диет с ω -6 и ω -3 ПНЖК в соотношении 4:1 ведущим фактором, определяющим интенсивность липопероксидации в митохондриях сердца, является видовой компонентный состав используемых ПНЖК, а не степень насыщенности.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, супероксидный радикал, полиненасыщенные жирные кислоты, митохондриальная фракция, сердце

DOI: 10.18097/PBMC20166201050

ВВЕДЕНИЕ

Окислительно-восстановительные процессы и, главным образом, процессы свободнорадикального окисления вовлечены в поддержание гомеостаза живого организма. В результате их интенсификации возможно накопление токсичных продуктов окисления, являющихся одной из причин разбалансировки гомеостаза, приводящей к серьезным метаболическим нарушениям, изменениям иммунного статуса, гормональным сдвигам и др. [1]. Основным патогенетическим фактором многих патологических состояний, сопровождающихся нарушением функционирования внутриклеточных органелл, является активация перекисного окисления липидов (ПОЛ). Пусковым фактором, способствующим развитию процесса свободнорадикального окисления, является увеличенное образование супероксидного радикала митохондриями, атакующего липидную основу мембран [2].

Основными субстратами ПОЛ являются полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), играющие, наряду со структурной, роль предшественников при синтезе важных регуляторных соединений – эйкозаноидов (простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов) [3]. Наиболее важными из них являются ПНЖК семейств ω -6 (линолевая кислота, LA; арахидоновая кислота, AA) и ω -3 (α -линоленовая кислота, α -LNA; эйкозапентаеновая кислота, EPA; докозагексаеновая кислота, DHA). Биологически активные вещества, образующиеся в процессе метаболизма этих ПНЖК, играют в организме важную роль, нередко оказывая противоположные эффекты [4, 5]. Избыточное количество в рационе ω -6 ПНЖК способствует

развитию целого ряда заболеваний, включая сердечно-сосудистые [6]. Учитывая, что пищевые источники ω -3 ПНЖК довольно ограничены, а соотношение ω -6/ ω -3 ПНЖК в рационе современного человека составляет 20:1, в сравнении с рекомендованным от 1:1 до 4:1 [7, 8], необходимо обогащать пищевой рацион добавками ω -3 ПНЖК. С другой стороны, остаются неизвестными побочные эффекты ω -3 ПНЖК, особенно в высоких дозах.

Целью данной работы явилось изучение особенностей процессов ПОЛ в митохондриальной фракции сердца крыс в условиях различного обеспечения полиненасыщенными жирными кислотами семейств ω -6 и ω -3.

МЕТОДИКА

Исследования проведены на белых беспородных крысах массой тела 90-110 г, содержащихся в течение 8 недель на полусинтетическом рационе вивария, составленного на основе диеты AIN-93 [9].

Животных разделили на 5 групп, рацион которых отличался по содержанию ПНЖК семейств ω -6 и ω -3: I (контроль) – крысы, получавшие ω -6 и ω -3 ПНЖК. Источником ω -6 кислот служило подсолнечное масло, а ω -3 кислот – рыбий жир; II (опытный контроль) – животные, находившиеся на рационе, лишённом пищевых источников ПНЖК; III – животные, в рацион которых добавляли соевое масло, содержащее LA и α -LNA; IV – животные, получавшие избыток ω -6 ПНЖК в составе подсолнечного масла; V – крысы, получавшие высокие дозы ω -3 ПНЖК в составе рыбьего жира (таблица).

ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ В ПРОЦЕССАХ ПОЛ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА

Таблица. Состав используемых жировых композиций и содержание ПНЖК семейств ω -6 и ω -3 в полусинтетических рационах крыс.

Группа животных	Жировой компонент рациона	Содержание ω -6 и ω -3 ПНЖК					Степень ненасыщенности
		ω -6, %	ω -3, %			ω -6 / ω -3	
		LA	α -LNA	EPA	DHA		
I	Подсолнечное масло и рыбий жир (6:1)	270,8	2,486	32,57	24,13	4,5	173,7
II	Отсутствует	-	-	-	-	-	-
III	Соевое масло	36,98	9,03	-	-	4.1	128,2
IV	Подсолнечное масло	44,86	0,303	-	-	148	166,3
V	Рыбий жир	1,627	0,668	32,57	24,13	0,028	191,7

Жировой компонент составлял 7% от сухой массы рациона. Анализ жирных кислот в жировых композициях рациона проводили методом газовой хроматографии на хроматографе HRGC 5300 (Италия). Для идентификации индивидуальных жирных кислот использовали стандартные препараты фирмы "Sigma" (США). Общую степень ненасыщенности жировых компонентов, получаемых животными диет, определяли методом [10].

Декапитацию животных осуществляли под лёгким эфирным наркозом на 4, 6 и 8 неделю с момента начала содержания животных на соответственном рационе. Для исследований использовали сердца животных. Митохондриальную фракцию выделяли методом дифференциального центрифугирования [11]. Об интенсивности процессов ПОЛ в митохондриальной фракции сердца судили по содержанию первичных, вторичных и третичных продуктов в изопропанольных экстрактах. Уровень гидроперекисей (первичных молекулярных продуктов липопероксидации) регистрировали в УФ-спектре: моногидроперекисей (ДК) при длине волны 232 нм, дигидроперекисей (ТК) при длине волны 268 нм. Содержание ДК выражали в мкмоль/мг белка, используя коэффициент молярной экстинкции $2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [12]. Величина оптической плотности при длине волны 278 нм отражала содержание вторичных продуктов ПОЛ (кетодиенов и сопряжённых триенов, КД+СТ); при длине волны 400 нм – конечных продуктов ПОЛ (шиффовых оснований) [13, 14]. Дополнительно определяли уровень продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов) по методу [15]. Скорость образования супероксидного радикала регистрировали в тесте с нитросиним тетразолием [16] и выражали в нмоль/мин на мг белка. Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури [17].

Полученные данные обрабатывали с использованием параметрических методов анализа (критерий Стьюдента). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований интенсивности процессов ПОЛ в митохондриальной фракции сердца крыс свидетельствуют о зависимости свободнорадикального окисления липидов от употребления различных видов и соотношения ПНЖК.

В митохондриальной фракции сердца крыс наиболее высокая концентрация первичных продуктов ПОЛ – ДК (рис. 1А) и ТК (рис. 1Б) обнаружена в группе животных, содержащихся в течение четырёх недель на диете, обогащённой ω -6 ПНЖК с соотношением ω -6/ ω -3 равным 148:1 в сравнении с показателями контрольной группы (содержание ω -6/ ω -3 равно 4:1). При увеличении срока пребывания крыс на указанных рационах до 6 и 8 недель, содержание первичных продуктов ПОЛ в митохондриальной фракции сердца крыс повышалось как у животных, получавших избыток ω -6 ПНЖК, так и у животных, получавших высокие дозы ω -3 ПНЖК в соотношении ω -6/ ω -3 равном 0,028:1.

Вместе с тем, интенсивность ПОЛ в мембранах митохондрий сердца зависит не только от дозы и соотношения ω -6 и ω -3 ПНЖК, но и от вида употребляемых жирных кислот. Так, у крыс, употреблявших LA (ω -6) и α -LNA (ω -3) в соотношении 4:1, уровень ДК и ТК превышал показатели крыс контрольной группы, получавшей LA (ω -6) и EPA+DHA (ω -3) в соотношении 4:1 на всех этапах эксперимента. Вероятно, одновременное введение в организм LA и α -LNA способствует увеличению их конкуренции за ферментативные системы, в частности за Δ^6 -десатуразу, катализирующую образование АА, способствующей процессам ПОЛ [18]. Другой причиной увеличения первичных продуктов ПОЛ может быть тот факт, что лишь 15% α -LNA в организме превращается в EPA и DHA, обладающих антиоксидантными свойствами [19, 20].

Следует отметить, что степень ненасыщенности жирных кислот не является определяющим фактором, способствующим образованию первичных продуктов ПОЛ. По нашим данным, уровень ДК и ТК в митохондриальной фракции сердца крыс значительно повышался у животных получавших высокие дозы ω -6 или ω -3 ПНЖК со степенью ненасыщенности жирового компонента 166,3 и 191,7 соответственно в сравнении с опытным контролем. В то же время, шести- и восьминедельное содержание крыс контрольной группы на рационе со степенью ненасыщенности жирового компонента – 173,3, не приводил к изменениям уровня продуктов ПОЛ в митохондриальной фракции сердца в сравнении с показателями опытного контроля (животные,

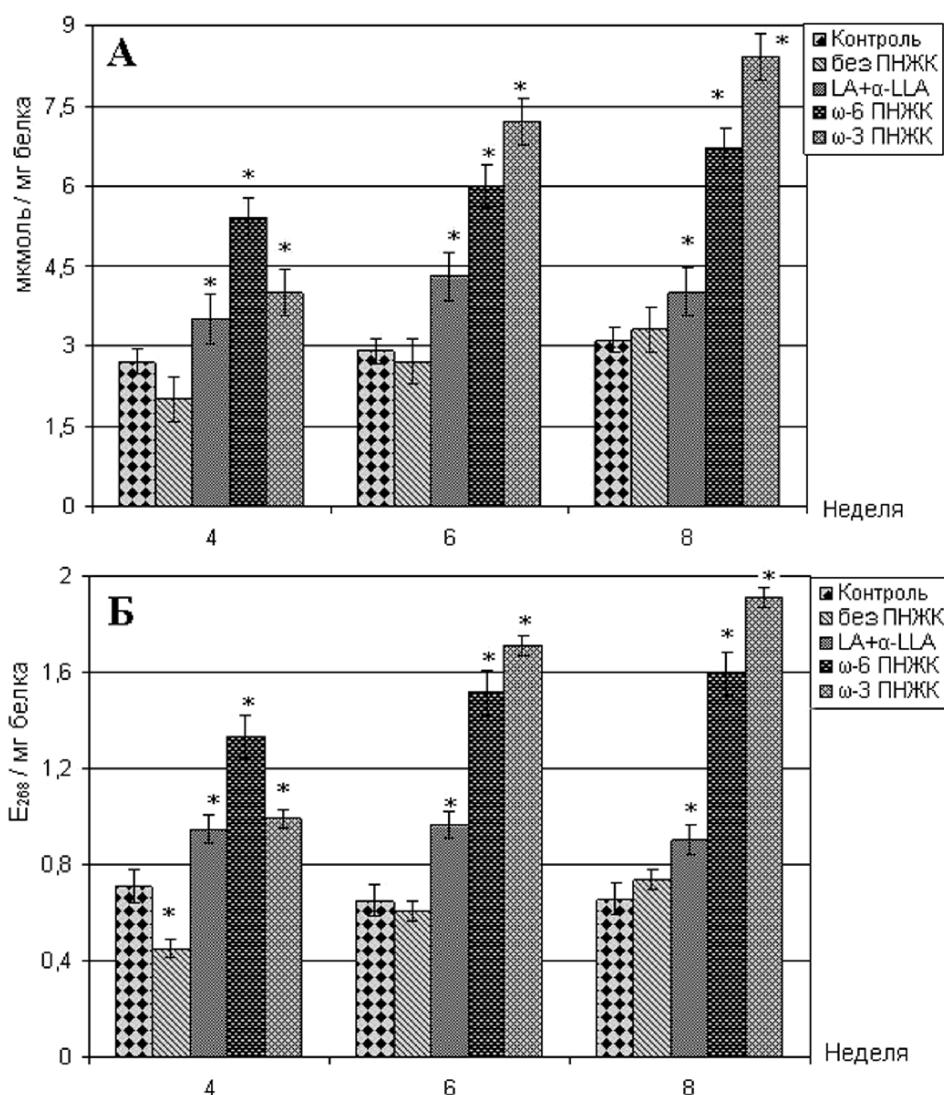


Рисунок 1. Содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов митохондриальной фракции сердца крыс в условиях различного обеспечения полиненасыщенными жирными кислотами. Контроль - группа животных, получавших линолевую, эйкозапентаеновую и докозагексаеновую кислоты; LA+α-LNA - животные, получавшие линолевую и α-линоленовую кислоты; ω-6 ПНЖК - животные, получавшие избыток ω-6 полиненасыщенных жирных кислот; ω-3 ПНЖК - животные, получавшие высокие дозы ω-3 полиненасыщенных жирных кислот; А - содержание диеновых конъюгатов; Б - содержание триеновых конъюгатов; * - статистически достоверные различия в сравнении с контрольным показателем ($p < 0,05$).

лишённые жирового компонента в рационе). Вероятно, только сбалансированное употребление ω-6 и ω-3 ПНЖК, в частности ЕРА и DHA, влияет на поддержание баланса между ПОЛ и антиоксидантной системой.

Повышение содержания диеновых и триеновых конъюгатов способствует образованию вторичных продуктов ПОЛ, поскольку гидроперекиси, будучи нестойкими соединениями, преобразуются в стабильные вторичные продукты [1].

Содержание крыс на диете, обогащённой ω-6 или ω-3 ПНЖК, приводил к интенсификации образования вторичных продуктов ПОЛ – КД и СТ, а также ТБК-активных продуктов в митохондриальной фракции сердца. Максимальные значения этих показателей по отношению к контролю обнаружены на шестой неделе эксперимента. Подобная тенденция

наблюдалась у животных, не употреблявших ПНЖК, у которых уровень КД+СТ и ТБК-активных продуктов в 1,8 и 2,9 раза превышал показатели контроля на шестую неделю эксперимента соответственно (рис. 2). Очевидно, дефицит в организме ПНЖК приводит к окислению жирных кислот, входящих в состав клеточных мембран, в том числе и митохондриальных, и последующему образованию вторичных продуктов ПОЛ. На восьмой неделе содержания на экспериментальной диете отмечено снижение уровня вторичных продуктов ПОЛ, особенно ТБК-активных продуктов.

Поскольку снижение ТБК-активных продуктов может свидетельствовать об образовании третичных продуктов окисления, следующим этапом эксперимента было определение уровня оснований Шиффа в митохондриальной фракции сердца.

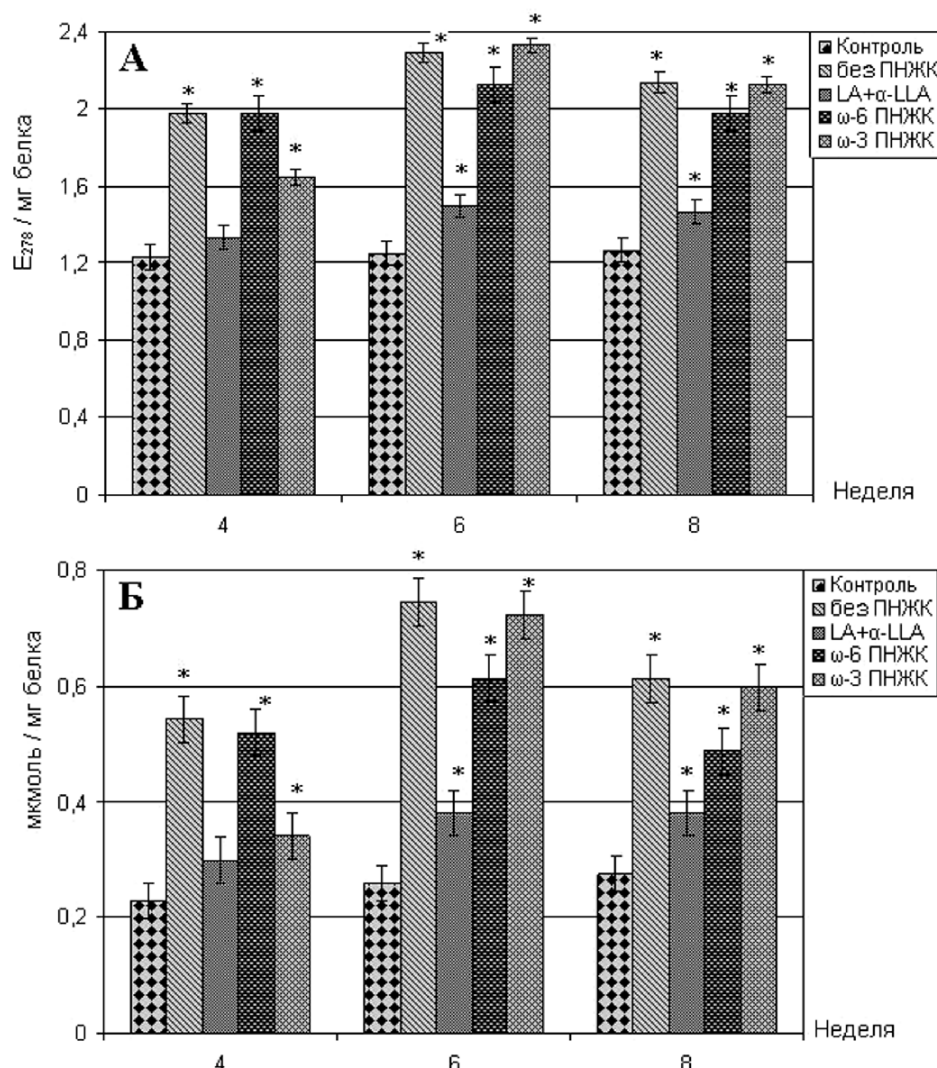


Рисунок 2. Содержание вторичных продуктов перекисного окисления липидов митохондриальной фракции сердца крыс в условиях различного обеспечения полиненасыщенными жирными кислотами. Контроль - группа животных, получавших линолевую, эйкозапентаеновую и докозагексаеновую кислоты; LA+α-LNA - животные, получавшие линолевую и α-линоленовую кислоты; ω-6 ПНЖК - животные, получавшие избыток ω-6 полиненасыщенных жирных кислот; ω-3 ПНЖК - животные, получавшие высокие дозы ω-3 полиненасыщенных жирных кислот; А - содержание кетодиенов и сопряженных триенов; Б - содержание ТБК-активных продуктов; * - статистически достоверные различия в сравнении с контрольным показателем ($p < 0,05$).

В группах животных, пищевой рацион которых в течение восьми недель был обогащён ω-6 или ω-3 ПНЖК, уровень Шиффовых оснований в митохондриальной фракции сердца увеличивался в 1,9 и 2,3 раза в сравнении с контролем и приближался к показателям опытного контроля (рис. 3). В то же время, одновременное применение LA и α-LNA не приводило к изменениям уровня оснований Шиффа в течение восьми недель диеты в сравнении с контролем.

Генерация супероксидного радикала была наиболее интенсивной в митохондриальной фракции сердца крыс, получавших ω-6 ПНЖК в течение четырёх недель или не получавших ПНЖК с пищей (рис. 4). В связи с этим следует отметить, что именно у данных животных уровень вторичных продуктов ПОЛ был самым высоким.

На последующих этапах эксперимента (шестая и восьмая недели с момента начала эксперимента) скорость образования супероксидного радикала наиболее выражена у животных, не получавших ПНЖК или получавших высокие дозы ω-3 ПНЖК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Полученные данные позволяют заключить, что интенсивность ПОЛ в митохондриальной фракции сердца крыс зависит как от дозы и соотношения ω-6 и ω-3 ПНЖК, так и от вида жирных кислот. Подтверждением этого является интенсификация процессов ПОЛ в митохондриальной фракции сердца крыс, получавших в качестве ω-3 α-линоленовую кислоту в сравнении с употреблением эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот.

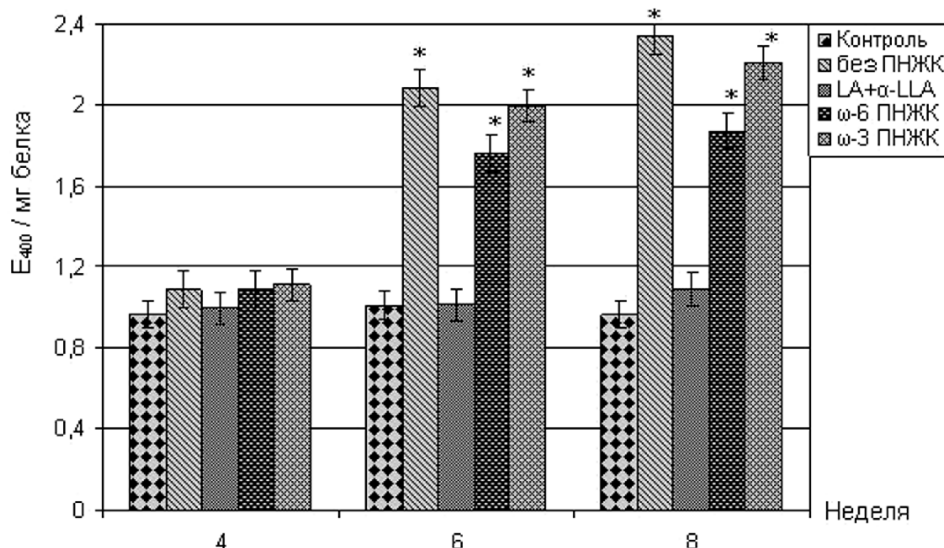


Рисунок 3. Содержание Шиффовых оснований в митохондриальной фракции сердца крыс в условиях различного обеспечения полиненасыщенными жирными кислотами семейств ω -6 и ω -3. Контроль - группа животных, получавших линолевую, эйкозопентаеновую и докозагексаеновую кислоты; LA+ α -LNA - животные, получавшие линолевую и α -линоленовую кислоты; ω -6 ПНЖК - животные, получавшие избыток ω -6 полиненасыщенных жирных кислот; ω -3 ПНЖК - животные, получавшие высокие дозы ω -3 полиненасыщенных жирных кислот; * - статистически достоверные различия в сравнении с контрольным показателем ($p < 0,05$).

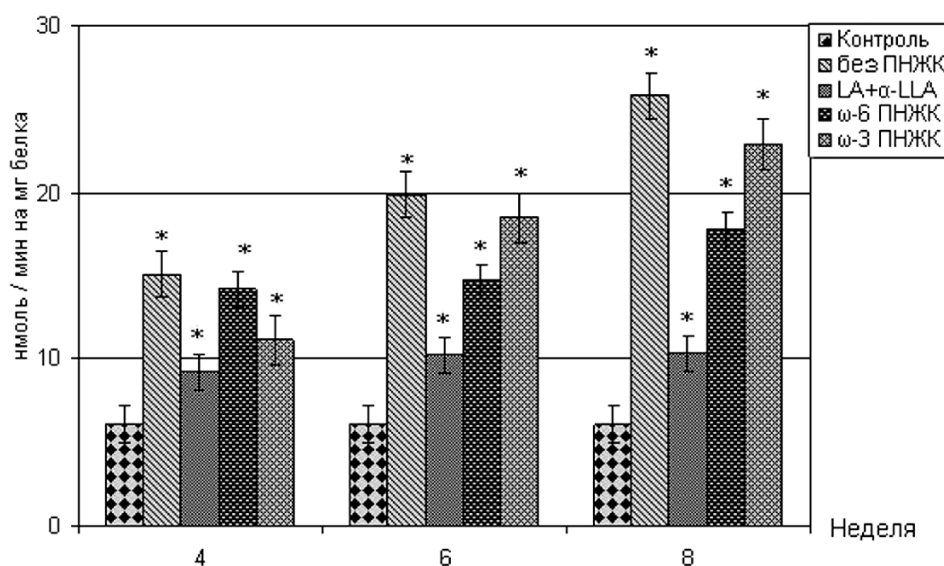


Рисунок 4. Скорость образования супероксидного радикала в митохондриальной фракции сердца крыс в условиях различного обеспечения полиненасыщенными жирными кислотами. Контроль - группа животных, получавших линолевую, эйкозопентаеновую и докозагексаеновую кислоты; LA+ α -LNA - животные, получавшие линолевую и α -линоленовую кислоты; ω -6 ПНЖК - животные, получавшие избыток ω -6 полиненасыщенных жирных кислот; ω -3 ПНЖК - животные, получавшие высокие дозы ω -3 полиненасыщенных жирных кислот; * - статистически достоверные различия в сравнении с контрольным показателем ($p < 0,05$).

Содержание крыс на пищевом рационе, обогащённом ω -6 ПНЖК, приводит к интенсификации процессов ПОЛ и генерации супероксидного радикала в митохондриальной фракции сердца крыс на всех этапах экспериментальной диеты, что, вероятно, связано с прооксидантными свойствами АА. Это может способствовать нарушению целостности мембран митохондрий, а также изменению функционирования компонентов электрон-транспортной цепи. Подобные изменения

наблюдаются у крыс, получавших высокие дозы ω -3 ПНЖК. Однако повышение процессов ПОЛ в митохондриальной фракции сердца крыс, с сопутствующей генерацией супероксидного радикала, наблюдается на более поздних этапах эксперимента – при шести- и восьминедельном введении ω -3 ПНЖК. Вероятно, на начальных этапах эксперимента активируется антиоксидантная система защиты, что приводит к обрыву цепи и к уменьшению образования продуктов ПОЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Третьяк Н.Н., Аношина М.Ю., Мошинская О.В. и др. (2002) Онкология, **4**, 29-32.
2. Камбачакова З.А. (2011) Журн. инфектологии, **3**, 63-67.
3. Bruins M.J., Dane A.D., Strassburg K. et al. (2013) J. Lipid Res., **54**, 1598-1607.
4. Lawson J.A., Kim S., Powell W.S., FitzGerald G.A., Rokach J. (2006) J. Lipid Res., **47**, 2515-2524.
5. Roberts L.J., Milne G.L. (2009) J. Lipid Res., **50**, 219-223.
6. Simopoulos A.P. (2008) Exp. Biol. Med., (Maywood), **233**, 674-688.
7. Simopoulos A.P. (2006) Biomed. Pharmacother., **60**, 502-507.
8. Wertz P.W. (2009) Toxicol and Health, **25**, 279-283.
9. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. (1993) J. Nutr., **123**, 1939-1951.
10. Kruatian T., Jitmanee K. (2013) Chiang Mai J. Sci., **40**, 419-426.
11. Weinbach T.C. (1961) Analyt. Biochem., **2**, 335-343.
12. Азизова Г.И., Эфендиев А.М. (2009) Биомед. химия, **55**, 779-783.
13. Волчегорский И.А., Налимов И.А., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. (1989) Вopr. мед. химии, **35**, 127-131.
14. Львовская Е.И., Волчегорский И.А., Шемяков С.Е. (1991) Вopr. мед. химии, **37**, 92-93.
15. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. (1987) Вopr. мед. химии, **33**, 118-122.
16. Марченко М.М., Кеца О.В. (2012) Укр. биохим. журн., **84**, 95-102.
17. Lowry O.H., Rosebrough M.J., Farr A.L., Randal R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
18. Jump D.B., Depner C.M., Tripathy S. (2012) J. Lipid Res., **53**, 2525-2545.
19. Tanito M., Brush R.S., Elliton M.N., Wicker L.D., Henry K.R., Anderson R.E. (2009) J. Lipid Res., **50**, 807-819.
20. Kandasamy N., Joseph F., Goenka N. (2008) Br. J. Diabet. Vasc. Dis., **8**, 121-128.

Поступила: 14. 07. 2014.
Принята к печати: 21. 11. 2014.

LIPID PEROXIDATION IN CARDIAC MITOCHONDRIAL FRACTION OF RATS EXPOSED TO DIFFERENT SUPPLEMENTATION WITH POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

O.V. Ketsa, I.O. Shmarakov, M.M. Marchenko

Fedkovich Chernivtsi National University,
2 Kotsyubinskogo str., Chernivtsi, 58012 Ukraine; tel.: 8(0372)58-48-38; e-mail: ketsa80@mail.ru

The effect of diet supplementation with polyunsaturated fatty acids (PUFAs) used at different ratios of ω -6/ ω -3 was studied on the content of primary (diene conjugates, DC; triene conjugates, TC), secondary (ketodienes, CD; coupled trienes, CT; TBA-active products) and terminal (Schiff bases) lipid peroxidation products (LPO) and generation of superoxide anion-radical in rat heart mitochondrial fraction. It was shown that diet supplementation with high doses of ω -6 or ω -3 PUFAs increased the content of primary, secondary and terminal LPO in rat heart mitochondrial fraction. Lipid peroxidation was accompanied by the intensification of superoxide anion-radical generation in rat heart mitochondrial fraction. During diet consumption with the PUFAs leading factor affecting the intensity of lipoperoxidation in rat heart mitochondria is fatty acid composition, rather than the level of their saturation.

Key words: lipid peroxidation, superoxide anion-radical, polyunsaturated fatty acids, mitochondrial fraction, heart