

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Е. И. Шишацкая

« 14 » июля 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Влияние омега-3 жирных кислот на про- антиоксидантный баланс крови
больных сердечно-сосудистыми заболеваниями

06.04.01- Биология

06.03.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель _____	06.07.2020	доцент, к.б.н. Н. М. Титова
Выпускник _____	06.07.2020	О.А.Ефимова
Рецензент _____	09.07.2020	доцент, к.б.н. Р.Н.Белоногов

Красноярск 2020

Реферат

Магистерская диссертация по теме «Влияние омега-3 жирных кислот на про- антиоксидантный баланс крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями» содержит 57 страниц текстового документа, 10 иллюстраций, 4 таблицы, 61 использованных источников.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС, АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА, ПРООКСИДАНТЫ, ГЛУТАТИОН, ГЛУТАТИОНЗАВИСИМЫЕ ФЕРМЕНТЫ, КАТАЛАЗА, СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА, МАЛОНОВЫЙ ДИАЛЬДЕГИД, ИНФАРКТ МИОКАРДА.

Объект исследования: эритроциты условно здоровых людей и людей, перенесших инфаркт миокарда

Цель исследования: оценить влияние омега-3 жирных кислот на про-антиоксидантный баланс крови больных сердечно-сосудистых заболеваний

Задачи:

1. Исследовать содержание малонового диальдегида в крови до и после лечения препаратом, содержащим омега-3 ПНЖК;
2. Оценить состояние АОС эритроцитов по активности ферментов: цитоплазматической СОД, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы и глутатионредуктазы до и после лечения препаратами с содержанием омега-3 ПНЖК.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о достоверном превалировании перекисных процессов над антиоксидантной активностью в эритроцитах больных, перенесших инфаркт миокарда. Препарат, содержащий омега-3 жирные кислоты, корректирует содержание малонового диальдегида и активность антиоксидантных ферментов, приближая их к показателям людей без ишемической болезни сердца.

Оглавление	
Реферат	2
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Активные формы кислорода и их характеристика	7
1.2 Окислительный стресс и его последствия для клеток	9
1.2.1 Перекисное окисление липидов	9
1.2.2 Окислительная модификация белков	11
1.2.3 Окислительная модификация нуклеиновых кислот.....	12
1.3 Антиоксидантная система организма	13
1.3.1 Супероксиддисмутаза.....	14
1.3.2 Каталаза.....	15
1.3.3 Глутатионовая антиоксидантная система	16
1.4 Инфаркт миокарда	20
1.5 Омега - 3- полиненасыщенные жирные кислоты	22
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	25
2.1 Объект исследования	25
2.2 Определение содержания гемоглобина	26
2.3 Определение содержания малонового диальдегида.....	27
2.4 Определение активности супероксиддисмутазы	28
2.5 Определение активности каталазы.....	30
2.6 Определение содержания восстановленного глутатиона	31
2.7 Определение активности глутатионпероксидазы.....	33
2.8 Определение активности глутатион-S-трансферазы	35
2.9 Определение активности глутатионредуктазы	36
2.10 Статистическая обработка результатов	37
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	38
3.1 Содержание продуктов перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов у людей, перенесших инфаркт миокарда	

Ошибка! Закладка не определена.

3.2 Динамика исследуемых показателей у больных, проходящих стандартное лечение и лечение Омега-3 жирными кислотами.....	Ошибка!
Закладка не определена.	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	Ошибка! Закладка не определена.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	39
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	40

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время заболевания сердечно-сосудистой системы (ССЗ) являются главной причиной смертности и инвалидизации населения во всем мире. Ежегодно от ССЗ в России умирает более 1.2 миллиона человек.

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) занимает главенствующее положение в статистике смертности от ССЗ, и является достаточно актуальной проблемой во всем мире.

Наиболее распространенной и опасной клинической формой ИБС является инфаркт миокарда (ИМ). Летальность при ИМ составляет 30–35% [41].

Риск развития инфаркта миокарда увеличивается с возрастом. С возрастом также наиболее интенсивно протекают окислительные процессы в организме, развивается окислительный стресс, что может повышать риск к появлению ССЗ.

Оксидативным стрессом называют процесс, при котором происходит повреждение клетки в результате реакций окисления. У человека оксидативный стресс является причиной большого количества серьезных заболеваний. Наиболее значимыми критериями оксидативного стресса являются продукты перекисного окисления липидов, нуклеиновых кислот и модифицированных белков.

В настоящее время идет поиск новых лекарственных средств, направленных на снижение заболеваемости ССЗ. Одним из таких средств являются омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, способные воздействовать на процесс развития ИБС.

В связи с этим цель данной работы заключалась в оценке влияния омега-3 жирных кислот на про- антиоксидантный баланс крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Исходя из цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать содержание малонового диальдегида в крови до и после лечения препаратом, содержащим омега-3 ПНЖК;

2. Оценить состояние АОС эритроцитов по активности ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы и глутатионредуктазы до и после лечения содержанием омега-3 ПНЖК.

Работа выполнена на кафедре медицинской биологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета и является частью комплексного исследования по изучению процессов свободно-радикального окисления липидов в норме и при различных патологиях, проводимого совместно с лабораторией молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ Медицинских проблем Севера СО РАН.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Активные формы кислорода и их характеристика

Активные формы кислорода (АФК) – это свободные радикалы, имеющие на внешней электронной оболочке неспаренный электрон [1]. АФК являются продуктами нормального клеточного метаболизма, и образуются в результате неполного восстановления кислорода. Умеренное количество АФК может оказывать положительное влияние на некоторые физиологические процессы, например, участвовать в процессах фагоцитоза и синтезе ряда соединений[2]. Также известна сигнальная функция АФК[3].

Высокие концентрации АФК в клетке – признак оксидативного стресса и причина гибели клеток.

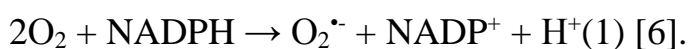
Важнейшими АФК являются синглетный кислород $^1\text{O}_2$, супероксидный радикал $\text{O}_2^{\cdot-}$, гидроксильный $\cdot\text{OH}$ и пероксидный HO^{\cdot}_2 радикалы, пероксидный ион HO_2^- , гипохлорит HOCl , перекись водорода H_2O_2 [4].

Источниками АФК в клетках являются пероксисомы, гладкий эндоплазматический ретикулум, плазмалемма макрофагов и эндотелиоцитов. Но наибольший вклад вносит дыхательная цепь митохондрий. Митохондриальная респираторная цепь является основным источником супероксидного анион-радикала, который способен быстро дисмутировать в другие формы свободных радикалов. Внутренняя митохондриальная мембрана содержит ряд ферментных комплексов, утечка электронов из которых приводит к образованию супероксидного анион-радикала.

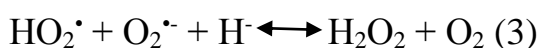
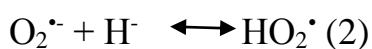
Существует ряд различных ферментов, работа которых приводит к образованию свободных радикалов, к ним относят: липооксигеназы, миелопероксидазы, NO-синтазы и многие другие. Липооксигеназы являются негемовыми ферментами железа, катализирующие диоксигенацию полиеновых жирных кислот, что приводит к образованию гидроперекисей.

Миелопероксидаза – фермент, локализованный в лизосомах нейтрофилов, макрофагов и моноцитов. Этот фермент хлорирует H_2O_2 до высокореактивного HOCl . Последний реагирует с H_2O_2 с образованием синглетного кислорода и хлорид-иона. Синглетный кислород не является свободным радикалом, но обладает свойствами, аналогичными АФК, благодаря своей электронной структуре [5].

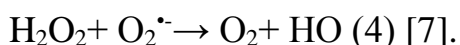
АФК генерируются в ходе различных процессов в организме. Супероксид анион продуцируется NADPH-оксидазной системой в ходе иммунного и воспалительного ответа. Фагоциты быстро поглощают большое количество O_2 , образуя супероксид $\text{O}_2^{\cdot-}$ за счет окисления цитозольного NADPH:



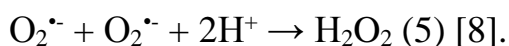
Образование гидроксид-иона и его протонированной формы – перекиси водорода происходит в результате одноэлектронного восстановления супероксидного радикала. Реакция протекает в две стадии:



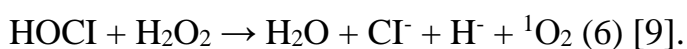
Также гидропероксильный радикал образуется при взаимодействии перекиси водорода с органическими радикалами или с супероксидным анион-радикалом:



Образованию пероксида водорода способствует спонтанная дисмутация супероксидного анион-радикала $\text{O}_2^{\cdot-}$:



Генерация синглетного кислорода осуществляется нейтрофилами в процессе «дыхательного взрыва»:



Поддержание на определённом уровне АФК тканей важно для регуляции нормальных физиологических процессов в организме, уровня

периферического сосудистого тонуса, уровня неспецифической и специфической иммунной защиты, уровня самообновления мембран клетки. Нарушения системы генерации и защиты от АФК приводят к нарушению течения воспалительных процессов, снижает общий специфический иммунитет и др.[7].

1.2 Окислительный стресс и его последствия для клеток

Антиоксидантная система принимает участие в защите организма от АФК. Когда эта система защиты перестает справляться с проблемой детоксикации образуемых АФК, то в клетке развивается окислительный стресс. Следствием этого процесса является повреждение мембранных структур из-за перекисного окисления липидов (ПОЛ), окисление белков, повреждение ДНК [10].

1.2.1 Перекисное окисление липидов

Процесс перекисного окисления липидов имеет важное значение в координировании таких процессов, как регулирование структуры мембран, распада ненасыщенных структурных липидов, апоптозе. Продукты ПОЛ делят на первичные (гидроперекиси, диеновые конъюгаты), вторичные (малоновый диальдегид), конечные (основания Шиффа). Большинство продуктов ПОЛ оказывает негативное влияние на клетки, подавляя активность гликолиза и ингибируя синтез белка и нуклеиновых кислот [11].

Окисляются обычно полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), благодаря наличию в их структуре от двух и более несопряженных двойных связей. Эти реакции протекают в основном в липидных структурах клеточных мембран и липопротеинов крови [12].

Перекисное окисление липидов включает в себя инициацию, продолжение, разветвление (развитие цепных реакций) и обрыв цепей.

Перекисное окисление липидов начинается с внедрения свободного радикала в липидный слой (инициация), который окисляет жирные кислоты.

Образуется липидный радикал, который реагирует с молекулярным кислородом. Таким образом, образуется новый свободный радикал. Этот радикал атакует следующий липид с образованием гидроперекиси липида и нового радикала. Процесс продолжается пока не произойдет обрыв цепи, в котором главное участие принимает антиоксидантная система.

Обрыв цепи окисления происходит в результате образования неактивного продукта путем взаимодействия двух радикалов, присоединением ионов металлов переменной валентности при условии достаточно высоких их концентраций, а также при действии антиоксидантной системы клетки [16].

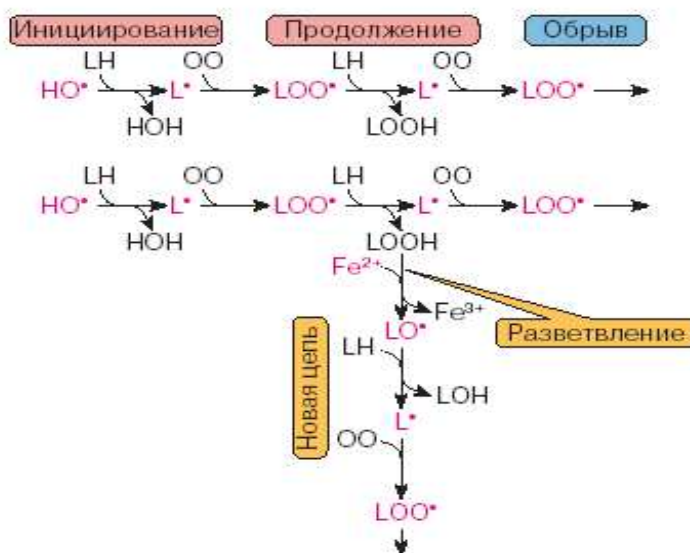


Рисунок 1 – Реакции перекисного окисления липидов

Важнейшим антиоксидантом является витамин Е, поскольку является жирорастворимым витамином, обладает гидрофобными свойствами и способен накапливаться, что позволяет ему быстро и эффективно реагировать с липидными гидроперекисями [13, 14].

Процесс перекисного окисления липидов ведет к образованию токсичных альдегидов, кетонов, предельных углеводородов и карбоксильных кислот. К примеру, МДА может способствовать повреждению мембран, что

приводит к нарушению их свойств и функций, таких как текучесть, ионный транспорт и др. [2].

В больших количествах продукты ПОЛ имеют разрушительный характер, но в физиологических условиях они постоянно присутствуют в клетках, так как продукты перекисного окисления липидов являются обязательным структурным элементом клеточных мембран. Продукты ПОЛ оказывают влияние на фазовое состояние липидного бислоя, усиливают гидратационные свойства поверхности клетки и др.[15,16].

1.2.2 Окислительная модификация белков

В организме человека окисление белков может происходить ферментативно и неферментативно. Ферментативное окисление может служить частью физиологических процессов нашего организма. Неферментативное окисление в большинстве случаев приводит к различным нежелательным последствиям [17].

Наиболее часто ОМБ подвергаются такие аминокислоты, как аргинин, лизин, пролин. Изменения белках затрагивают не только первичную структуру, но и способны изменять вторичную и третичную структуру белков, что сопровождается нарушением структуры белковой глобулы с образованием крупных белковых агрегатов за счёт межмолекулярных связей, в связи с чем данные белки более подвержены протеолизу и конформационным изменениям[18].

Окислительная модификация белков начинается с отсоединения водорода от α -углеродного атома полипептидной цепи с последующим образованием алкильного радикала белка, который далее реагирует с O_2 , в результате чего образуется алкилперокси - радикальное промежуточное соединение, которое может дать алкилпероксид, затем алкоксил-радикал. Последний, в свою очередь превращается в гидроксил-производное белка. При отсутствии кислорода окисление белка заканчивается на этапе образования углеродного центра, который может прореагировать с другими

радикальными центрами с образованием белок-белковых сшивок R_1CCR_2 . Агрегации молекул белков способствует образование S-S мостиков между цистеиновыми остатками 2,2' - бифенильных сшивок тирозиновых остатков белков. Между радикальными центрами аминокислотных остатков могут образовываться ковалентные связи [5,6,19].

1.2.3 Окислительная модификация нуклеиновых кислот

АФК могут быть причиной окислительной модификации нуклеиновых кислот, что является особо неблагоприятным процессом, так как ДНК является носителем наследственной информации. При взаимодействии нуклеиновых кислот со свободными радикалами происходят модификации азотистых оснований, появление новых ковалентных связей, а также расщепление сахарофосфатного остова, что ведет к фрагментации ДНК [20].

Наиболее сильным повреждающим агентом нуклеотидных остатков признан гидроксильный радикал [21]. Чаще всего гидроксильный радикал взаимодействует с азотистыми основаниями, что ведет к их структурной модификации. Результатом этого является ослабление гликозидной связи, образование апиридиновых/апуриновых сайтов, что сопровождается расщеплением рибозофосфатного остова.

Огромное влияние на ДНК оказывают продукты ПОЛ. «В частности, малоновый диальдегид встраивается в азотистые основания, что изменяет структуру молекулы ДНК и ведёт к нарушению её функций. Также МДА способен образовывать аддукты с белками и углеводами, что приводит к потере их биологической активности» [22].

1.3 Антиоксидантная система организма

Защиту от воздействия АФК выполняет антиоксидантная система (АОС)[16].

Антиоксиданты участвуют в трех линиях защиты организма. Первая линия защиты – это антиоксиданты, которые подавляют образование свободных радикалов, нейтрализуя перекись водорода и гидропероксидов до воды и спиртов. К ним относятся супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза и др.

Вторая линия защиты – антиоксиданты, отвечающие за удаление активных радикалов. К ним относится витамин С, мочевая кислота, билирубин, альбумин, тиолы и др.

Третья линия защиты – антиоксиданты, участвующие в восстановлении окисленных молекул.

АОС организма можно разделить на специфическую и неспецифическую. Специфическая АОС направлена на разрушение АФК и продуктов их дальнейших превращений [23].

Также антиоксиданты можно разделить на ферментативные и неферментативные. Ферментативная группа АО обладает способностью разрушать свободные радикалы, а также участвовать в разложении гидроперексидов нерадикальным путем [21]. Неферментативная АОС включает различные по химическому строению и свойствам соединения, которые снижают скорость образования свободных радикалов и уменьшают концентрацию продуктов реакций, протекающих с участием радикалов (глутатион, аскорбат, цистеин, токоферол, витамин А и др.) Классификация АО приведена на рис.2.

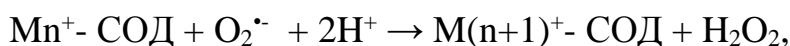
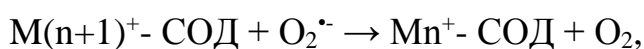


Рисунок 2 – Классификация антиоксидантов [22].

1.3.1 Супероксиддисмутаза

Супероксиддисмутаза – один из основных ферментов антиоксидантной системы, выступающий на первой линии защиты. СОД устраняет супероксидный радикал ещё на стадии одноэлектронного восстановления кислорода. Представляет собой группу металлоферментов, катализирующих реакцию дисмутации супероксидного радикала в кислород и перекись водорода.

Реакция, катализируемая супероксиддисмутазой, расписывается в два этапа и схематично выглядит так:



где М (переходный металл) = Cu (n=1); Mn (n=2); Fe (n=2); Ni (n=2)».

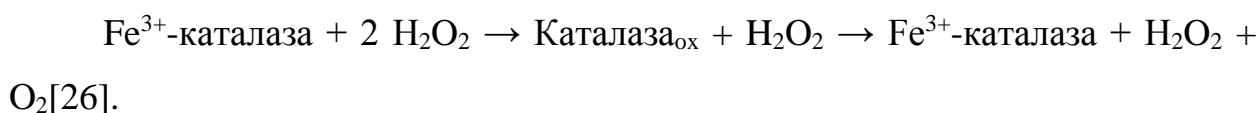
Супероксиддисмутаза имеет несколько изоферментных форм, различающихся строением активного центра. Cu,Zn-СОД присутствует в основном в цитозоле клетки. Каждая субъединица содержит по одному иону меди и цинка, имеет внутри цепи дисульфидный мостик, одну сульфгидрильную группу и ацетилированную концевую аминогруппу[24].

В организме человека существует три типа СОД. СОД1 находится в цитоплазме (цитоплазматическая), СОД2 – в митохондриях (митохондриальная), а СОД3 – неклеточная (экстраклеточная, экстрацеллюлярная) форма[25].

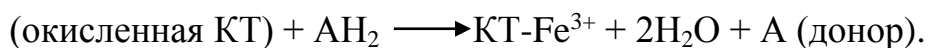
1.3.2 Каталаза

Каталаза – тетрамерный фермент, содержащий по одной гемовой простетической группе на субъединицу. Основная роль каталазы – превращение пероксида водорода в воду. В организме человека локализуется преимущественно в эритроцитах, а также в печени и почках. Ген, кодирующий КТ, у человека расположен на длинном плече хромосомы 11 (11p13).

Разложение перекиси водорода каталазой осуществляется в два этапа:



В окисленном состоянии КТ катализирует окисление спиртов, фенолов или альдегидов:



Синтез каталазы осуществляется на свободных полисомах с последующим посттрансляционным механизмом переноса ферментов внутрь пероксисомы [26,27].

Каталаза почти не требует энергии активации, при этом долго сохраняет свою активность. Известно, что КТ может присоединять четыре молекулы NADPH, что предохраняет её от инактивации и повышает ферментативную активность[28].

При резком снижении каталазы, или полном ее отсутствии развивается заболевание акаталазия. Клиническими проявлениями акаталазии является развитие язвенных процессов вокруг зубов, причина которых - воздействия перекиси, вырабатываемой бактериями. Также на понижение каталазной

активности влияет недостаток витаминов А, В, фолиевой кислоты, биотина [29].

1.3.3 Глутатионовая антиоксидантная система

Система глутатиона выполняет множество функций, например, участие в восстановлении перекиси, продуктов перекисного окисления липидов и выведение их из организма в виде нетоксичных конъюгатов. Также глутатион регулирует клеточную пролиферацию и фиброгенез [30].

Значение глутатиона в клетке определяется его антиоксидантными свойствами. Глутатион является основным внутриклеточным антиоксидантом с мощным детоксикационным действием и принимает участие во многих ферментативных и неферментативных путях антиоксидантной защиты. Он существует в организме в двух формах: восстановленной (GSH, активной) и окисленной (GSSG, неактивной). Соотношение концентраций в норме составляет 10/1 соответственно, а уменьшение соотношения является маркером оксидативного стресса [31].

В организме человека существует 4 линии антиоксидантной защиты. К первой линии защиты относится супероксиддисмутаза. Она восстанавливает свободные радикалы с образованием перекисей. Ко второй линии защиты относят каталазу и глутатионпероксидазу. Они отвечают за восстановление свободных радикалов до воды. Третья линия защиты представлена глутатионпероксидазой и глутатионтрансферазой. Их функцией является восстановление органических перекисей. Четвертая линия защиты представлена глутатионтрансферазой, выполняющей схожие функции с третьей линией защиты [30].

Система глутатиона обеспечивает защитное действие при помощи 3 составляющих: антиоксидантной защиты (главным антиоксидантом которой является глутатион), иммуностимуляции (стимуляции естественных киллеров и активации Т-лимфоцитов), и детоксикации (выведении токсинов и химических веществ) [32].

Глутатион

Глутатион – это низкомолекулярный тиол, образованный остатками трех аминокислот – глутаминовой кислоты, цистеина и глицина. Существует в двух формах: восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) [33]. На долю восстановленной формы приходится 90-95%, а количество окисленной формы не превышает 1% [32].

Основным инструментом глутатиона в реализации антиоксидантного и детоксикационного действия служит сульфгидрильная группа (SH). Она вовлечена как донор электрона в антиоксидантных реакциях нейтрализации огромного количества токсичных окисленных субстратов в организме.

Глутатион принимает участие в синтезе белка, фосфорилировании и стабилизации структуры белка [33]. Основным источником глутатиона, циркулирующего в плазме, является печень.

Процесс синтеза происходит в 2 стадии:

1. L-глутамат + L-цистеин + АТФ → γ -глутамил-L-цистеин + ADP + Pi
2. γ -глутамил-L-цистеин + L-глицин + АТФ → GSH + ADP + Pi

γ – глутамилцистеин синтетаза и глутатион синтетаза играют роль катализаторов [34].

Глутатион выводится из плазмы крови и утилизируется преимущественно почками и легкими с помощью эндотелиоцитов, альвеолярных клеток легких, эпителия проксимальных почечных канальцев.

Можно выделить три вида транспорта GSH: внутриклеточный, межклеточный, межорганый.

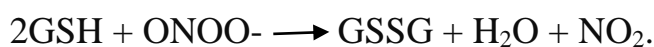
Особенность внутриклеточного транспорта – зависимость от жидкостности мембран. Увеличение жидкостности восстанавливает транспорт GSH.

Межклеточный транспорт в головном мозге осуществляется астроцитами, которые занимаются транспортировкой глутамина и цистеинглицина, необходимого для синтеза этого фермента.

Межорганный транспорт окисленного, восстановленного глутатиона осуществляется белками множественной лекарственной резистентности, полипептидами, и белками, связывающими ГТФ-связывающие белки[32].

Глутатионпероксидаза

Глутатионпероксидаза относится к семейству селенсодержащих гомотетрамерных ферментов, по этой причине GPO часто называют селеноцистеиновой пероксидазой. Основной функцией GPO является восстановление H_2O_2 и органические ROOH до воды и спирта ROH. Также глутатионпероксидаза нейтрализует пероксинитрит:



Фермент играет важную роль, ингибируя процесс перекисного окисления липидов, и поэтому защищает клетки от окислительного стресса.

Впервые ГПО, как фермент АОС, была обнаружена и описана в 1957 году Гордоном Миллсом. По структуре является гомотетрамером. Каждая субъединица имеет массу 19 кДа и содержит один атом селена, который связан с цистеиновыми остатками. Селеноцистеин добавляется в растущую полипептидную цепь во время трансляции стоп-кодона UGA[34,35].

Изучено и описано 7 изоформ глутатионпероксидазы:

Глутатионпероксидаза 1 – классическая, цитозольная ГПО. Имеет 4 одинаковые субъединицы, включающие атом селена. Находится в цитоплазме клеток печени и кишечника, эритроцитах и защищает клетки от индуцированного апоптоза в раковых клетках молочной железы.

Глутатионпероксидаза 2 – желудочно-кишечная ГПО. Важна для роста и дифференциации эпителиальных клеток. У человека локализована в печени и толстой кишке.

Глутатионпероксидаза 3 – плазматическая ГПО. Обнаружена во многих органах, но наибольшее содержание отмечается в эпителии проксимальных канальцев почек. Принимает участие в восстановлении циркулирующих пероксидов [36].

Глутатионпероксидаза 4 – (фосфолипид-гидропероксид – глутатионпероксидаза) – изофермент, содержащий 1 атом селена. Преобладает в яичках. Экспрессируется во всех тканях и клетках. Легко взаимодействует с мембранами благодаря остаткам гидрофобных аминокислот [35].

Глутатионпероксидаза 5 – секреторная ГПО. Выполняет функцию защиты мембран сперматозоидов от ПОЛ.

Глутатионпероксидаза 6 – ГПО эмбрионов и обонятельного эпителия. Экспрессируется в латеральной назальной железе.

Глутатионпероксидаза 7 – не содержит селена. Экспрессируется во многих тканях и структурно схожа с ГПО-4 [36].

Глутатион – S – трансфераза

Глутатион-S-трансферазы (GST, КФ 2.5.1.18) это ферменты с молекулярной массой 50 кДа. Каждая субъединица глутатион-S-трансфераз содержит каталитический сайт (G-сайт и H-сайт). В суперсемействе глутатион-S-трансфераз выделяют 3 субсемейства изоформ: митохондриальные, микросомальные и цитозольные. Около 90% активности данного фермента в клетке приходится на долю цитозольных изоформ [37].

Глутатион-S-трансфераза представляет собой цитоплазматический белок, ответственный за конъюгацию сульфгидрильной SH-группы восстановленного глутатиона с электрофильными атомами углерода, азота, серы и кислорода молекул ксенобиотиков, детоксикацию и миграцию этих молекул [35]. GST присутствуют практически во всех органах и тканях, но наибольшее содержание фермента определяется в печени.

Глутатион-S-трансферазы могут восстанавливать гидроперекиси до спиртов, используя GSH в качестве косубстрата:



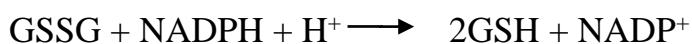
Большинство реакций, осуществляемых глутатион-S-трансферазой, можно разделить на 4 типа: [32].

1. Присоединение к субстрату восстановленного глутатиона:
 $R + GSH \rightarrow HRSG$
2. Нуклеофильное замещение: $RX + GSH \rightarrow RSG + HX$
3. Восстановление органических гидропероксидов и эндопероксидов до спиртов: $ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O$
4. Изомеризация. Механизм реакции включает промежуточное присоединение восстановленного глутатиона, который используется как кофермент.

Глутатионредуктаза

Глутатионредуктаза – цитоплазматический белок. Впервые была обнаружена в 1931 году в печени животных. Этот фермент функционально связан с ГПО. Представляет собой флавоэнзим семейства флавопротеиндисульфидредуктаз. Действие глутатионредуктазы зависит от уровня NADPH и, следовательно, от состояния пентозофосфатного пути и активности ее ключевого фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Глутатионредуктаза восстанавливает окисленный глутатион, используя NADPH, образовавшийся в пентозофосфатном пути, по следующей реакции:

GR



1.4 Инфаркт миокарда

Инфаркт миокарда - это гибель сердечных миоцитов в результате ишемии и последующего недостаточного снабжения данного участка кислородом. Летальность при ИМ составляет 30 - 35% [40].

Основным симптомом инфаркта миокарда является сильная боль продолжительного характера в области сердца, грудной клетки с иррадиацией в левое плечо, шею, ухо, ключицу.

Инфаркт миокарда является наиболее распространенной и опасной клинической формой ИБС. Существует мнение, в основе которого фактором

патогенеза ИБС является воспалением, регулируемое системой первичных и вторичных медиаторов. Выявлена взаимосвязь между уровнями ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6 и тяжестью клинических проявлений ИБС[41].

Чаще всего основой для развития инфаркта миокарда является атеросклеротическое поражение венечных артерий и сужение их просвета.

Гиперхолестеринемия является наиболее важным повреждающим фактором в этом процессе. Окисленные ЛПНП оказываются в субэндотелиальном пространстве сосуда и заполняют его продуктами своего распада, что ведет к образованию пенистых клеток. Результатом гибели пенистых клеток являются атеросклеротические бляшки, а в интиму попадает накопленный клетками ХС. При разрыве фиброзной капсулы содержимое контактирует с тромбоцитами, вследствие чего образуется тромб[41].

К другим факторам развития ИМ относятся активация процесса апоптоза, Важное значение имеют рецепторы семейства фактора некроза опухоли (Fas-рецептор/Fas-лиганд).

Не последнюю роль в ишемическом повреждении миокарда занимают процессы свободнорадикального окисления липидов. Например, малоновый диальдегид (МДА), образованный в процессе ПОЛ, способен образовывать шиффовы основания с аминокетонами белков, понижая текучесть мембраны, нарушая процессы пиноцитоза и фагоцитоза. Продукты ПОЛ снижают активность антиоксидантных ферментов в ишемизированной ткани, тем самым вызывая обширное повреждение кардиомиоцитов и снижение функциональных свойств миокарда[42,43].

Обязательным этапом диагностики инфаркта миокарда является электрокардиография (ЭКГ) и эхокардиография (ЭхоКГ). Также проводят исследование различных ферментов, которые при гибели кардиомиоцитов высвобождаются в кровь. Инфаркт миокарда диагностируют, если в крови подтверждается наличие сердечного тропонина Т (сТnТ) и сердечного тропонина I (сТnI). У пациентов с инфарктом миокарда уровень концентрации сТnI увеличен до 100 мг/л. Оба этих биомаркера

высвобождаются в кровь через 2-4 часа после появления симптомов инфаркта миокарда[44]. Сердечный тропонин Т (сTnT) и сердечный тропонин I (сTnI) остаются в кровотоке более 10 дней, достигая пика через 1-2 дня. Из-за своего длительного нахождения в крови эти биомаркеры считаются наиболее чувствительными и специфичными. Также исследуют содержание креатинфосфокиназы (КК) лактатдегидрогеназы, общего ХС, ЛПНП, ЛПВП[45,46].

Людям, находящимся в зоне риска развития инфаркта миокарда, рекомендуется ограничить потребление жирной пищи, приветствуется физическая активность и отказ от курения и алкоголя[47].

1.5 Омега - 3- полиненасыщенные жирные кислоты

Омега-3 жирные кислоты представляют собой группу полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), имеющих двойную углерод-углеродную связь в омега-3-позиции. Наличие двойных связей делает длинные молекулы кислот более «гибкими» и реакционноспособными.

Всего существует 11 видов омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Самыми распространенными из них являются эйкозапентаеновая кислота (ЭПК) - состоит из двадцати углеродных атомов и 5-ти двойных цис-связей, докозагексаеновая кислота (ДГК) – животного происхождения, состоящая из двадцати двух атомов углерода, в составе молекулы есть 6 цис-связей, и альфа-линоленовая кислота (АЛК) – растительного происхождения, содержит 18 углеродных атомов и 3 двойных цис-связи. В организме человека ПНЖК не вырабатываются в нужном количестве, поэтому их необходимо получать из различных источников пищи [48].



Рисунок 3 - Пространственные модели полиненасыщенных жирных кислот [49].

В организме человека Омега-3 ПНЖК играют важную роль, так как они являются структурными компонентами всех клеточных мембран[49,50]. Встраивание омега-3 жирных кислот в фосфолипидный слой происходит не только в мембрану клеток, но и в мембрану органелл. Это приводит к нормализации работы Ca^{2+} -насоса и уменьшает Са-нагрузку. Также одним из ключевых полезных эффектов омега-3 жирных кислот является то, что, производные от них эйкозаноиды оказывают меньший воспалительный эффект. В дополнение к производству менее воспалительных эйкозаноидов, омега-3 жирные кислоты также сокращают производство медиаторов воспаления, которые, как известно, повышаются при сердечной недостаточности: цитокинов, фактора некроза опухоли- α (ФНО), интерлейкина- 1β (ИЛ-1) и интерлейкина-6 (ИЛ-6); фактора транскрипции κB (NF- κB), а также активных форм кислорода[50].

Известно, что ЭПК и ДГК оказывают влияние на взаимодействие микроорганизмов и клеток. Воздействие омега-3 ПНЖК на врожденный и приобретенный иммунитет осуществляется путем модификации кишечной микробиоты вследствие перекисного окисления омега-3 ПНЖК бактериальной каталазой и ферментов супероксиддисмутазы. Это приводит к выработке токсичных для микроорганизмов антибактериальных субстанций, оказывая прямую антибактериальную активность[51].

Омега-3 жирные кислоты в основном синтезируются в водорослях и фитопланктоне и передаются рыбам и морским млекопитающим по пищевой цепи. Жирная рыба (скумбрия, тунец, сельдь, сардины), печень нежирной

рыбы (треска и палтус), ракообразные, двустворчатые и головоногие являются основными источниками омега-3[41,52].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования данной работы служили эритроциты. Было обследовано 62 больных, перенесших инфаркт миокарда и обратившихся за лечением в кардиологическое отделение Института медицинских проблем Севера СО РАМН. В качестве контрольной группы обследовано 19 условно здоровых людей аналогичного возраста (без сердечно-сосудистой патологии).

Были выделены 3 группы больных:

1 – больные с выраженным нарушением ритма сердца (20 человек, НРС > 1000);

2 – больные с умеренно выраженным нарушением ритма сердца (НРС < 500 – 1000), получавшие стандартную терапию (21 человек);

3 – больные с умеренно выраженным нарушением ритма сердца (НРС < 500 – 1000), получавшие стандартную терапию и комплекс полиеновых жирных кислот Омега-3 (21 человек).

Диагноз устанавливался врачами кардиологического отделения «НИИ медицинских проблем Севера» Красноярского научного центра СО РАН на основе данных Холтеровского мониторирования.

Кровь забиралась из локтевой вены, утром натощак, после поступления больного в стационар, в качестве антикоагулянта использовали гепарин. Плазму крови и эритроциты разделяли центрифугированием. Кровь центрифугировали 15 мин при 1700 g. После центрифугирования плазму осторожно отбирали и удаляли. Эритроциты отмывали от плазмы физиологическим раствором. Для этого их ресуспендировали в 5-кратном объеме 0,9%-ного раствора NaCl, центрифугировали при вышеуказанных условиях. Надосадочную жидкость удаляли, процедуру повторяли 3 раза. Упакованные эритроциты замораживали и хранили при – 20°C до проведения анализов [53,с.6].

2.2 Определение содержания гемоглобина

Принцип метода: гемоглобин крови при взаимодействии с железосинеродистым калием (красная кровяная соль) окисляется в метгемоглобин, образующий с ацетонциангидриномгемиглобинцианидом (цианметгемоглобин), оптическая плотность которого при 540 нм пропорциональна концентрации гемоглобина в образце крови.

Реактивы:

1. Трансформирующий реагент – сухая смесь (натрий углекислый кислый, 1,0 г; калий железосинеродистый, 200 мг);
2. Ацетонциангидрин;
3. Калибровочный раствор гемоглобина с концентрацией 120 г/л

Ход определения: к 5 мл трансформирующего раствора добавляли 0,02 мл гемолизата (разведением не более, чем в 10 раз), хорошо перемешивали. Определение проводили через 10 мин против холостой пробы (трансформирующего раствора), окраска устойчива в течение не менее 1 часа. Определение оптической плотности опытных проб регистрировали на спектрофотометре проводили на спеколе при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. По оптической плотности в калибровочной пробе, содержащей стандартный раствор гемоглобина (120 мг/мл), проводили расчет содержания гемоглобина в опытных образцах и выражали в мг/мл упакованных эритроцитов» [53, с.10-11].

Расчёт: содержание гемоглобина рассчитывают по формуле:

$$Hb = \frac{D_o}{D_x} * 120 * F, \text{ где:}$$

Hb – содержание гемоглобина в опытной пробе, г/л;

Do – оптическая плотность опытной пробы;

Dx – оптическая плотность калибровочной пробы;

120 – содержание гемоглобина в калибровочном растворе, г/л;

F – фактор разведения

2.3 Определение содержания малонового диальдегида

«Принцип метода: в липидных системах в результате процессов перекисного окисления липидов образуется малоновыйдиальдегид (МДА), взаимодействие которого с 2-тиобарбитуровой кислотой приводит к образованию хромогена с максимумом поглощения в красной области видимого спектра при длине волны 532 нм.

Реактивы:

1. 0,9%-ный раствор NaCl (физиологический раствор);
2. 30%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ);
3. 0,1М раствор динатриевой соли этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, Mr = 372,24г/моль);
4. 1%-ный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК);
5. 0,05 н раствор NaOH.

Ход определения:

Последовательность приготовления проб и план действий при подготовке проб для измерения содержания малонового диальдегида представлены в табл. 1.

Таблица 1-Порядок внесения реагентов в пробу

Реагент	Опытная проба	Контрольная проба
Физиологический раствор	0,8	0,8
Дистиллированная вода	-	0,2
Упакованные эритроциты	0,2	-
ТХУ	0,5	0,5
Центрифугировали 15 мин при 1700g, отбирали супернатант		
Супернатант	1,0	1,0
ЭДТА	0,075	0,075
ТБК	0,25	0,25
Содержимое пробирок перемешивали и ставили в кипящую водяную баню на 15 мин. Затем пробирки охлаждали до комнатной температуры		

Измеряли поглощение опытной пробы против контрольной на спектрофотометре при 532 нм в кюветах с толщиной слоя 1 см.

Расчет:

Расчёт содержания МДА производят с учётом коэффициента молярной экстинкции образовавшегося хромогена, равного $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ и выражают в мкмоль/ г Нв»[53, с.12].

$$C = \frac{D_{532} \times V_{p.c.} \times F \times 1000}{V_{np} * \varepsilon * d * Hb},$$

где:

C – содержание МДА, мкмоль/г Нв;

D_{532} – оптическая плотность при длине волны 532 нм;

$V_{p.c.}$.- объем реакционной смеси;

F – фактор разведения;

ε – коэффициент молярной экстинкции образовавшегося хромогена ($1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$);

V_{np} . – объем супернатанта, используемый для определения содержания МДА;

d – длина оптического пути кюветы (1 см);

$1000/Hb$ – коэффициент пересчета на г Нв.

2.4 Определение активности супероксиддисмутазы

Принцип метода: определение активности супероксиддисмутазы основано на ингибировании реакции автоокисления адреналина в щелочной среде в присутствии СОД, вследствие дисмутации супероксидных анион-радикалов, которые являются продуктом одного из этапов окисления и одновременным участником его последующих стадий.

Об интенсивности автоокисления адреналина судят по динамическому нарастанию поглощения при длине волны 347 нм, обусловленному накоплением продукта окисления, не описанного ранее в литературе, и опережающим по времени образованием адренохрома (с максимумом поглощения при 480 нм).

Реактивы:

1. 0,1%-ный (5,46 мМ) аптечный раствор адреналина.
2. Бикарбонатный буфер, pH=11 (2,12 г Na_2CO_3 , 0,168 г NaHCO_3 , 0,074 г ЭДТА растворяли в 200 мл дистиллированной воды: pH доводили до нужного значения добавлением NaOH).
3. Этанол-хлороформная смесь (2:1).

Ход определения: В качестве источника СОД используют эритроцитный гемолизат. В пробирку вносили 50 мкл эритроцитов и 450 мкл дистиллированной воды, охлажденной до 0°C. Добавляли 250 мкл этанол-хлороформной смеси, устраняющей мешающее влияние Hb. Далее перемешивали пробы и оставляли инкубироваться при комнатной температуре 10 мин. Полученную суспензию перемешивали и центрифугировали 15 мин при 8000g. Измерение проводится в кювете с длиной оптического пути 1,0 см. Для определения СОД использовали супернатант. Готовили контрольную и опытные пробы по схеме, представленной в табл. 2.

Таблица 2 – Состав инкубационных проб

Реагенты	Холостая проба	Опытная проба
Бикарбонатный буфер	3 мл	3 мл
Супернатант	-	0,05 мл
Адреналин	0,15 мл	0,15 мл

После внесения адреналина в пробу содержимое быстро перемешивают. Изменение оптической плотности регистрируют через каждые 30 сек в течение 3 мин.

Расчет:

Для расчета активности использовали показатели величины поглощения контрольной и опытной проб. Активность СОД выражают в усл. ед./мин/г Нб»[53, с.16-17].

$$\text{Ед. активности СОД} \frac{\text{СОД}}{\text{г}} = \left(\frac{E_x - E_0}{E_x} \right) * \frac{100\% * F * V * 1000}{50 * v * d * \text{Нб}}$$

где:

$$\frac{E_x - E_0}{E_x} * \frac{100\%}{50} \text{ единица активности, } 50\% \text{ ингибирование реакции}$$

окисления адреналина;

V – общий объем инкубационной пробы (3,2 мл);

F – фактор разведения (15);

v – объем супернатанта, используемого для определения активности СОД (0,05 мл);

d – длина оптического пути кюветы (1,0 см);

1000/Нб – коэффициент пересчета на г Нб.

2.5 Определение активности каталазы

Принцип метода: определение активности каталазы основано на образовании окрашенного в желтый цвет комплекса неразрушенной в ходе каталазной реакции перекиси водорода с молибдатом аммония.

Реактивы:

1. 0,03%-ный раствор пероксида водорода;

2. 4%-ный раствор молибдата аммония.

Ход определения: для определения активности фермента готовят контрольную и опытную пробы. В обе пробирки наливают по 2 мл раствора пероксида водорода. Затем в опытную пробу вносят 0,01 мл гемолизата, приготовленного в соотношении 1:49 (эритроциты: дистиллированная H₂O,

охлаждённая до 0°C), в контрольную – 0,01 мл дистиллированной воды. Пробы перемешивают и инкубируют в течение 10 минут при комнатной температуре. По завершении инкубации реакцию останавливают добавлением 1 мл раствора молибдата аммония.

Измерение:

Измеряют экстинкцию опытной и контрольной проб на спектрофотометре при длине волны 400 нм против дистиллированной H₂O в кювете с толщиной слоя 1,0 см. Активность каталазы рассчитывали, используя коэффициент экстинкции пероксида водорода, равный 22,2×10³ мкМ⁻¹см⁻¹ и выражают в мкмолях разрушенной H₂O₂*мин на грамм Hb» [53].

Расчет активности каталазы осуществляли по формуле:

$$A = \frac{(E_x - E_0) * V * F * 1000}{t * v * \varepsilon * d * Hb},$$

где:

E_x – оптическая плотность контрольной пробы;

E₀ – оптическая плотность опытной пробы;

V – общий объём инкубационной смеси (3,01 мл);

F – фактор разведения (50);

v – количество гемолизата (0,01 мл);

t – время (10 мин);

ε – коэффициент экстинкции перекиси водорода (22,2 * 10³ мМ⁻¹*см⁻¹)

d – длина оптического пути (1,0 см)

1000/Hb – коэффициент пересчета на г Hb.

2.6 Определение содержания восстановленного глутатиона

Принцип метода: определение основано на взаимодействии GSH с 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой (далее – ДТНБК) с образованием окрашенного в желтый цвет аниона 2-нитро-5-тиобензоата.

Реактивы:

1. Осаждающий раствор: 1,67 г ледяной ортофосфорной кислоты, 0,2 г ЭДТА и 30 г хлористого натрия растворяли в дист. H₂O и доводили до метки 100 мл.

2. Фосфатный буфер: 0,3 М Na₂HPO₄.

3. 0,02%-ный раствор дитионитро(бис)бензойной кислоты, приготовленный на 1 %-ном растворе цитрата натрия.

Ход определения: источником GSH служил гемолизат, приготовленный добавлением 0,2 мл отмытых от плазмы и упакованных эритроцитов к 1,8 мл дист. H₂O, охлажденной до 0°C. Для осаждения белков к гемолизату добавляли 3 мл осаждающего раствора. Пробы тщательно перемешивали и после 20 мин выдерживания при комнатной температуре фильтровали через крупнопористый фильтр. Фильтрат должен быть прозрачным и бесцветным.

Измерение:

1 мл фильтрата помещали в спектрофотометрическую кювету объемом 3 мл, добавляли 2 мл фосфатного буфера и измеряли оптическую плотность при длине волны 412 нм. Затем в пробу вносили 0,5 мл раствора ДТНБК. Сразу же после перемешивания должна появиться желтая окраска из-за образования тионитрофенильного аниона глутатиона с ДТНБК. Поскольку раствор ДТНБК имеет слабо-желтую окраску, параллельно с опытной пробой готовили контрольную, содержащую вместо фильтрата осаждающий раствор, разведенный дист. H₂O в отношении 2:5.

Расчет:

Содержание восстановленного глутатиона рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции окрашенного аниона (13600 M⁻¹cm⁻¹), образующегося при взаимодействии GSH с ДТНБК и выражали в мкмоль на грамм Hb» [53].

Содержание восстановленного глутатиона рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{E_2 - E_1}{\varepsilon} * F * K * \frac{1000}{[Hb]},$$

где:

C - концентрация восстановленного глутатиона в мкмоль/г Hb;

E1 - оптическая плотность опытной пробы до добавления ДТНБК;

E2 - оптическая плотность опытной пробы после добавления ДТНБК;

ε – коэффициент молярной экстинкции образовавшегося окрашенного аниона ($13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$);

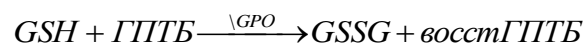
F – фактор разведения;

K - отношение оптической плотности контрольной пробы до добавления ДТНБК и после добавления;

$1000/[\text{Hb}]$ – коэффициент пересчета на г Hb.

2.7 Определение активности глутатионпероксидазы

Принцип метода: глутатионпероксидаза (GPO) катализирует реакцию взаимодействия глутатиона (GSH) с гидроперекисью трет-бутила (ГПТБ):



Активность фермента оценивается по изменению содержания GSH в пробах до, и после инкубации с модельным субстратом в ходе цветной реакции с ДТНБК.

Реактивы:

1. 0,1 М трис-HCl буфер с 0,01%-ным содержанием ЭДТА pH=8,5;
2. Сложный буфер (78 мг азидата натрия, 100 мг восстановленного глутатиона растворяют в 100 мл 0,1 М трис-HCl буфера с 0,01%-ным содержанием ЭДТА pH=8,5) готовится новый реактив перед каждым определением;
3. 0,14%-ный раствор ГПТБ (коммерческий препарат). Готовится новый реактив перед каждым определением;
4. 20%-ный раствор ТХУ;
5. Абсолютный метанол;
6. 0,4%-ный раствор ДТНБК, разведенный на абсолютном метаноле.

Ход определения: Отмытые и упакованные эритроциты гемолизируют охлажденной до 0°C водой в соотношении 1:200. 0,2 мл гемолизата смешивают с 0,73 мл сложного буфера и термостатируют 10 мин при 37°C. Реакцию инициируют внесением в реакционную смесь 0,07 мл раствора ГПТБ. Строго по секундомеру, через 5 мин инкубации при 37°C, реакцию останавливают добавлением 0,2 мл раствора ТХУ. В контрольные пробы раствор ГПТБ вносят после осаждения белка ТХУ. Полученные пробы центрифугируют при 1700g в течение 10 мин. Супернатант используют для определения количества восстановленного глутатиона. Для этого к 0,1 мл супернатанта добавляют 2,65 мл 0,1 Мтрис-НСl буфера и 0,025 мл раствора ДТНБК.

Измерение:

После перемешивания пробы фотометрируют на спектрофотометре, при длине волны 412 нм, в кювете с длиной оптического пути 1,0 см против дистиллированной Н₂О (опытную пробу против контрольной – холостой) [42].

Расчет:

Активность фермента в эритроцитах выражают в мкмольх GSH, окисленного за 1 мин на грамм Hb, используя коэффициент молярной экстинкции (13600 М⁻¹×см⁻¹) окрашенного аниона, образующегося при взаимодействии GSH с ДТНБК»[53,с.18-19].

Активность рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(E_x - E_0) * V * 1000}{\varepsilon * \nu * Hb},$$

где:

A – активность ГПО в мкмоль/мин/гHb;

E_x– оптическая плотность контрольной пробы;

E₀ – оптическая плотность опытной пробы;

V – общий объём реакционной смеси (2,775 мл);

v – количество супернатанта (0,1 мл);

1000/Нв – коэффициент пересчета на г Нв.

2.8 Определение активности глутатион-S-трансферазы

Принцип метода: активность глутатион-S-трансферазы (GST) определяют по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между ГSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ).



Увеличение концентрации конъюгатов в ходе реакции регистрируют спектрофотометрически при длине волны 340 нм (максимум поглощения глутатион-S-ХДНБ).

Реактивы:

1. 0,1 М калий-фосфатный буфер, рН=6,5;
2. 0,015 М раствор восстановленного глутатиона;
3. Метанол;
4. 0,015М раствор ХДНБ (готовится на метаноле).

Ход определения: отмытые и упакованные эритроциты гемолизируют охлаждённой до 0°C водой в соотношении 1:20. В кювету с длиной оптического пути 1,0 см, помещают 2,5 мл калий-фосфатного буфера (рН=6,5), добавляют 0,2 мл раствора восстановленного глутатиона и 0,1 мл гемолизата. Реакцию инициируют внесением в кювету 0,2 мл раствора ХДНБ. Сразу же после этого перемешивают пробу и зануляют прибор.

Измерение:

Регистрацию оптической плотности проводят в течение 3 минут при температуре 25°C и длине волны 340 нм.

Расчет:

Активность фермента рассчитывают, используя коэффициент миллимолярной экстинкции для GS-ХДНБ при длине волны 340 нм, равный

9,6 мМ⁻¹*см⁻¹, и выражают в ммольях образующихся глутатион S-конъюгатов в минуту на грамм Hb» [53,с.19-20].

Активность рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{\Delta E * V * 1000}{v * \varepsilon * Hb},$$

где:

A – активность GST в мкмоль/мин/гHb;

ΔE – изменение оптической плотности в минуту;

V – общий объем реакционной смеси;

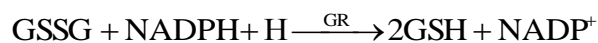
v –объем пробы, используемый для определения активности GST;

ε– коэффициент молярной экстинкции при λ=340нм (9,6 мМ⁻¹*см⁻¹)

1000/Hb – коэффициент пересчета на г Hb.

2.9 Определение активности глутатионредуктазы

Принцип метода: глутатионредуктаза (GR) катализирует восстановление окисленного глутатиона (GSSG) в восстановленную форму (GSH) за счёт NADPH.



Определение активности GR основано на измерении скорости окисления NADPH, которая регистрируется спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности при длине волны 340 нм.

Реактивы:

1. 50 мМ калий-фосфатный буфер pH 7,0 (содержащий 1мМ ЭДТА)
2. 0,1 мМ раствор NADPH
3. 0,5 мМ раствор GSSG.

Ход определения: активность GR определяют в гемолизате, приготовленном добавлением к одному объему упакованных эритроцитов девятикратного объема дистиллированной H_2O , охлажденной до $0^\circ C$. В спектрофотометрическую кювету с расстоянием между рабочими гранями 1,0 см последовательно вносят 2,7 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера pH 7,0 (содержащего 1мМ ЭДТА), 0,1мл 0,1мМ раствора NADPH и 0,1 мл гемолизата (источник фермента). Реакцию запускают добавлением в реакционную пробу 0,1 мл 0,5 мМ раствора окисленного глутатиона. Изменение оптической плотности регистрируют через 1 минуту в течение 3 минут против пробы, содержащей все компоненты, кроме окисленного глутатиона. Активность фермента выражают в мкмольях окисленного NADPH за минуту на грамм Hb (учитывая коэффициент экстинкции для NADPH при длине волны 340 нм, равный $6,22 \text{ мкМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$)» [53,60].

2.10 Статистическая обработка результатов

Для обработки полученных результатов использовалась программа Statistica 8.0 и MicrosoftExcel. Обработку результатов проводили с помощью подсчета медианы и интерквартильного разброса (C25 и C75 процентели). Проверку гипотезы о статистической достоверности двухвыборок проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для независимых выборок [54].

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ССЗ-сердечно-сосудистые заболевания

ИБС-ишемическая болезнь сердца

ИМ-инфаркт миокарда

ПНЖК-полиненасыщенные жирные кислоты

АОС-антиоксидантная система

NADPH- кофермент

ПОЛ- перекисное окисление липидов

ДНК-дезоксирибонуклеиновая кислота

МДА- малоновыйдиальдегид

ОМБ- окислительная модификация белков

СОД- супероксиддисмутаза

СР- свободные радикалы

КТ- каталаза

GSH-восстановленный глутатион

GPO-глутатионпероксидаза

GST-глутатион-S- трансфераза

GR-глутаионредуктаза

ЛПНП-липопротеины низкой плотности

ЛПВП-липопротеины высокой плотности

ХС-холестерин

НРС- нарушения ритма сердца

ЭПК-эйкозапентаеновая кислота

ДГК-докозагексаеновая кислота

АЛК- альфа-линоленовая кислота

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Подколзин, А.А. Система антиоксидантной защиты и старения / А.А. Подколзин и [др.] // профилактика старения. – 2000. – Т. 61, №2. –вып. 3. – С.14–23.
2. Узбеков, М.Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психических заболеваниях. / М. Г. Узбеков // Социальная и клиническая психиатрия. – 2014. – Т. 24., № 4. – С. 97-103.
3. Moreno-Loshuertos R. Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants/ R. Moreno-Loshuertos // Nature genetics.-2006.-№ 11. - P.1261-1268.
4. Фридович, И. В. Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода / И. В. Фридович // Свободные радикалы в биологии. – 1979. – Т. 1. – С. 7-21.
5. Bhattacharyya, A. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases/ A. Bhattacharyya// Physiol. Rev. – 2014. – V. 94, № 2. – P. 329-354.
6. Ribeiro, T. P. Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress/ T. P. Ribeiro [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 2015. – V. 80. – P. 67-76.
7. Донцов, В.И. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / В.И. Донцов, В.Н. Крутько // Труды ИСА РАН. – 2006. – Т. 19. – С.51
8. Antunes, F. Quantitative biology of hydrogen peroxide signaling / F. Antunes, P. Matos Brito // Redox Biology. - 2017. - Vol. 13. - P.1-7.
Электронный ресурс [Режим доступа]:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231717301891>

9. Щепин, А. С. Время жизни синглетного кислорода в столкновительных комплексах O₂-CO₂ / А. С. Щепин, С. А Пешков, Т. В. Пешкова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2016. – № 3 (191). – С. 92-97.

10. Новиков, В. Е. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция. / В.Е. Новиков, О.С. Левченкова, Е.В. Пожилова // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Т. 12., № 4. – С. 13-21.

11. Перепечай, Я. И. Содержание малонового диальдегида и активность антиоксидантных ферментов в плазме крови больных механической желтухой [Электронный ресурс]/ Я. И. Перепечай, Е.Ю. Меркулова// Научное сообщество студентов XXI столетия. Естественные науки: сб.ст. по мат. VII междунар. студ. науч.-практ. конф. – 2013. - № 7. – Режим доступа: <https://sibac.info/studconf/natur/vii/31406>.

12. Свойства и функции липидов/[Электронный ресурс]/ -Режим доступа :<https://biokhimija.ru>.

13. Pizzino, G. Oxidative stress: harms and benefits for human health. / G. Pizzino [et. al] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2017. – 13p.

14. Ayala, A. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. / A. Ayala, M. F. 42 Muñoz, S. Argüelles // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2014. – 31p.

15. Меньщикова, Е. Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков // Фирма «Слова». – 2006. – 556 с.

16. Янковский, О.Ю. Токсичность кислорода и биологические системы/ О.Ю.Янковский// Спб. – Игра, 2000. – 294с.

17. Isoda, R. The role of protein oxidative modification in periodontal diseases. / R. Isoda, K. Matsushita// New York- springer, 2014.- P. 15-32

18. Мартусевич, А. К. Оксидативный стресс и его роль в формировании дизадаптации и патологии. / А. К. Мартусевич, К. А. Карузин // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2015. – Т. 2., № 2. – С. 5-14.
19. Donnea, I. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress/ Isabella DalleDonnea [et al.] // ClinicaChimicaActa. - 2003.- Vol.329.- P.23–38.
20. Сухоруков, В.С. Клиническое значение индивидуальных особенностей митохондриальной ДНК/ В.С. Сухоруков и [др.] // Научная статья по специальности «Медицина и здравоохранение». - 2015.
21. Путилина, Ф.Е. Свободнорадикальное окисление. Учебное пособие / Ф. Е. Путилина и [др.] // – Спб.- 2008. – 161 с
22. Ланкин, В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологиях: учебное пособие для врачей / В. З. Ланкин, А. К. Тихазе, Ю. Н. Беленков // – Москва: Наука. – 2001. – С. 14-39.
23. Чанчаева, Е.А. Современное представление об антиоксидантной системе организма человека / Е.А. Чанчаева, Р.И. Айзман, А.Д. Герасев // Экология человека. – 2013. – №7. – С. 50-54.
24. Goodsell, D. Superoxide Dismutase [Electronic resource]/ D. Goodsell// Molecular explorations through biology and medicine. – 2007. – Access mode: <https://pdb101.rcsb.org/motm/94>
25. Волыхина, В. Е. Супероксиддисмутазы: структура и свойства/ В. Е. Волыхина, Е. В. Шафрановская // Вестник ВГМУ. – 2009. – Т.8, №4. – С. 6-12.
26. Карбышев, М.С. Биохимия оксидативного стресса/ М.С. Карбышев, Ш.П. Абдуллаев // Учебно-методическое пособие. - 2018. – С.60
27. Goldman, B. Biogenesis of peroxisomes: intracellular site of synthesis of catalase and uricase /B.Goldman, G. Blobel// Proc. Nat. Acad. Sci. USA.- 1978.—75, №10. - P. 5066—5070
28. Ighodaro, O.M. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid/ O.M. Ighodaro, O.A. Akinloye// Alexandria Journal of Medicine Available online. - 2017. - P. 1-6. Электронный ресурс

[Режимдоступа]:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090506817301550>

29. Чупахина, Г.Н. Антиоксидантные свойства культурных растений калининградской области /Г.Н. Чупахина П.В. Масленникова, Л.Н. Скрыпник, П.В.Федураев, Н.Ю.Чупахина// Вестник Томского государственного университета. Биология.- 2012.- № 2 (18).- С. 171–185

30. Толпыгина, О. А. Рольглутатионавсистемеантиоксидантнойзащиты (обзор)/ О. А.Толпыгина // ActaBiomedicaScientifica.-2012. -№2(84).-С.5-9

31. Продукция активных форм кислорода/[Электронный ресурс]/- Режим доступа: <http://medicalplanet.su>.

32. Кулинский, В.И. Система глутатиона: синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биомедицинская химия, 2015. – Т.55, №3. – С. 255-277.

33. Lallement, P.A. The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants / В. Brouwer, O. Keech, A.Hecker, N. Rouhier //Frontiers in Pharmacology. -2014.-№5

34. Ithayaraja, C.M. Mini-review: metabolic functions and molecular structure of glutathione reductase /C.M. Ithayaraja// Intern. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2011. V. 9. - P. 104–115.

35. Ляхович, В.В., Вавилин В.А., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в монооксидазных реакциях. Бюллетень СО РАМН, №4 (118), 2005 – С.7-12

36. Матейкович, П. А. Глутатионпероксидаза как фермент системы антиоксидантной защиты клеток/ П. А. Матейкович// Международный научный журнал. – 2016. – Т. 3, № 6. – С. 21-24.

37. Shiping, H. Glutathione-S-transferase enhances proliferation-migration and protects against shikonin-induced cell death in breast cancer cells / H. Shiping // The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2011. –V. 27, I.11. – P. 479-480.

38. Utomo, A. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential

for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells/A.Utomo, X.Z. Jiang, S.Furuta, J.Yun//Biol. Chem.-2004, P.-43522–43529.

39. Баймухаметова, Э.А. Глутатиониглутатион-S- трансферазы: важнейшиекомпонентысистемыантиоксидантнойзащитырастений/ Э.А. Баймухаметова, Р.М. Таипова, Б.Р. Кулуев// Биомика, 2016, Том 8, № 4. – С. 311-322

40. Sproston, N.R. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection / N.R. Sproston, J.J. Ashworth// Frontiers in Immunology. 2018.- № 9.-P. 754.

41. Бунина, В. А. Ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда: от патогенеза к молекулярным маркерам диагностики/ В.А. Бунина, Н. С. Линьковаа, Е. О. Кожевниковаа и др.// УСПЕХИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК.- 2020.- том 51, № 1.- С. 33–45.

42. Antman, E.M. Chapter 35: Acute Myocardial Infarction./ E.M. Antman, E.Braunwald, etal. (eds.)//HeartDisease. WB Saunders Co.- 2001.-P. 1114–1231

43. Гордеев, И. Г. Оценка влияния миокардиальных цитопротекторов на процессы перекисного окисления липидов у больных стабильной стенокардией до и после хирургической реваскуляризации миокарда / И.Г. Гордеев [и др.] //Российский кардиологический журнал. - 2005.-№3.- С.33-45.

44. Esterbauer, H. The role lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL/H.Esterbauer,J.Gebicki, H.Puhl, G.Jurgens //Free Radic Boil Med. - 1992. - №13 (4).-P.341.

45. Burcu, B. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics/B.Burcu, M. Kemal // Talanta.2018.-V132.-P.162-174

46. Arshad, M.K. Cardiac Biomarkers: Invasive to Non-invasive Assessments /M.K. Arshad [et al] // Current Medicinal Chemistry. 2016. V. 23(37). -P. 4270–4284

47. Thygesen, K. Универсальное определение инфаркта миокарда/ K.Thygesen, J. Alpert, H. White/Рациональная фармакотерапия в кардиологии. -№ 4.-2008.-С.93

48. Shahidi, F. Omega-3 (n-3) fattyacidsinhealthanddisease: part 1dcardiovasculariseaseandcancer/F. Shahidi, H.Miraliakbari// J. Med. Food. - 2004.- V.7. P.387–401.

50. Гладышев, М.И. Незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты и их пищевые источники для человека /М.И. Гладышев //Институт биофизики СО РАН. Journal of Siberian Federal University. Biology. - 2012 .- №4. - С.352-386

51. Громова, О.А. Перспективы использования стандартизированных форм омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в неврологии/О.А.Громова, И.Ю.Торшин, А.Г.Калачева и др.//Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. -2012.-С.101–105.

52. Gutiérrez, S. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells /S.Gutiérrez, S.L.Svahn, M.E. Johansson //IntJMolSci.- 2019.-№ 20(20).-P.528.

53. Shahidi, F. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits/F.Shahidi, P.Ambigaipalan// Rev. Food Sci. Technol. №9 (1).-2018.-P.5

54. Оценка структурно-функционального состояния клетки: метод. указания к практическим занятиям /сост.: Н.М. Титова, Т.Н. Замай, Т.Н. Субботина, А.А. Савченко. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – 60 с.

55. Ребова, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. /О.Ю. Ребова. – М: Медиасфера. - 2002. - 312с.

56. Тарасов, Н.И. Состояние перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты крови у больных инфарктом миокарда, отягощенным недостаточностью кровообращения/ Н.И. Тарасов, и др. // Тер. архив. – 2002. – № 12. – С. 12-15.

57. Курашвили, Л.В. Современное представление о перекисном окислении липидов и антиоксидантной системе при патологических

состояниях/ Л.В. Курашвили, Г.А. Косой, И.Р. Захарова// – Пенза: Институт соверш. врачей МЗ РФ, 2003. – 32 с.

58. Searle, A.I. Glutathione peroxidase: effect of superoxide, hydroxyl and bromide free radicals on enzyme activity /A.I. Searle, R.L. Willson, H.C. Grossman // *Int. J. Radical. Biol.* – 2006. – V. 37, № 5. – P.213-217.

59. Моисеев, В. С. Полиненасыщенные омега-3 жирные кислоты («Омакор») в кардиологии / В. С. Моисеев // *Клиническая фармакология и терапия.* - 2006. - № 15. – С. 48-50

60. Петрова, Н.В. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты в кардиологии / Н.В. Петрова // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика: Научно-практический рецензируемый медицинский журнал.* 2005. -№ 4. - С. 101-107.

61. Carlberg, I. Glutathione reductase / I. Carlberg, B. Mannervik // *Methods in Enzymology*, 1985. – V. 113. – P. 484–490.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии


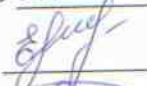

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

Е. И. Шишацкая
« 14 » июля 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Влияние омега-3 жирных кислот на про-антиоксидантный баланс крови
больных сердечно-сосудистыми заболеваниями

06.04.01- Биология
06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный руководитель		06.07.2020	доцент, к.б.н.	Н. М. Титова
Выпускник		06.07.2020		О.А.Ефимова
Рецензент		09.07.2020	доцент, к.б.н.	Р.Н.Белоногов

Красноярск 2020