

УДК 577.125.8+612.1+616.127.005.8

М. К. Карагезян

Особенности влияния гипоксического синдрома при зеараленоновой интоксикации на механизм формирования срывов резистентности эритроцитов к перекисному гемолизу и корригирующее действие сверхнизких доз физиологически активных соединений

(Представлено академиком А.А. Галояном 16/III 2004)

Гипоксические состояния, в частности при микотоксиновых отравлениях, характеризуются понижением степени резистентности эритроцитов к перекисному гемолизу [1,2].

В работе отражены основные положения, свидетельствующие об особенностях перестройки молекулярных механизмов, ответственных за формирование повышенного фона перекисеобразования в условиях экспериментального зеараленонового токсикоза. В основе сложного симптомокомплекса болезненных проявлений специально акцентируется патогенетическая роль ярко выраженного гипоксического синдрома (ГС), ставшего предметом наших настоящих исследований.

Исследования проводили на 80 беспородных белых крысах-самцах с моделированным зеараленовым микотоксиновым токсикозом. Стабилизированную на оксалате кровь (1:9), забранную шприцем из *angulus venosus* (место слияния подключичной и верхней полой вен) в количестве 2 мл, переносили в толстостенные пробирки и центрифугировали при 3-4000 об/мин на протяжении 10 мин. Образовавшуюся надосадочную жидкость сливали, осадок промывали 2-3 раза охлажденным физиологическим раствором с рН 7.3-7.4, придерживаясь описанных выше условий центрифугирования. Заключительное центрифугирование производили при 5000 об/мин в течение 15-20 мин, уплотненный осадок эритроцитов использовали для определения степени их резистентности к перекисному гемолизу с применением цианметгемоглобинового метода [3], содержания малонового диальдегида (МДА) [4,5] и уровня эндогенного плазменного α -токоферола [6], определенного спектрофлуорометрически на флуорометре фирмы "Хитачи" (Япония). С использованием известных методов осуществляли изоляцию и очистку мембран эритроцитов (МЭ) [7], а также количественное определение в них белка [8].

Цель настоящего исследования заключалась в выявлении и изучении особенностей изменения процесса перекисеобразования в эритроцитах и МЭ на фоне развитого гипоксического синдрома, а также возможных путей лимитирования интенсивности его течения применением: 1) парентеральных введений сверхнизких доз (10^{-12} М) тиосульфата натрия (ТСН) и кальциевого преципитата дрожжевой низкомолекулярной двуспиральной РНК (Ca^{2+} -дс-РНК) в отдельности и 2) в виде комбинированной антиоксидантотерапии путем сочетанных введений использованных активных начал.

Как известно, липидная пероксидация, являясь сложным сочетанием реакций, в определенных пределах интенсивности своего течения выступает в роли физиологически необходимого и обязательного компонента в регуляции жизнедеятельности клетки в целом. В то же время считается неоспоримым [9-15] ее участие в качестве мощного патогенетического фактора в случаях чрезмерной активации процесса перекисеобразования с выходом особо высоких концентраций токсических продуктов переокисления липидов, обуславливающих в известной степени молекулярные механизмы стартирования, развития и генерализации болезненных состояний различного профиля. Как результат формирующегося при этом ГС выступают поражения периферических органов, в том числе и поджелудочной железы.

При ГС немаловажное значение придается физиологическому состоянию эритроцитов и их мембран как важнейших фиксаторов и транспортеров кислорода, а также носителей мощного катализатора процессов свободнорадикального окисления (СРО) липидов - гемоглобина [1].

Как явствует из данных табл. 1, 2, на фоне зеараленоновой интоксикации отчетливо проявляется картина ярко выраженного активирования реакции СРО липидов как в эритроцитах, так и особенно в их мембранах. Интенсификация процессов перекисеобразования в эритроцитах при исследованной патологии является своеобразным объяснением природы основных элементов патогенетического комплекса изученной патологии, обусловленной, в частности, мембранотоксическим, а в далеко зашедших случаях и мембранолитическим действием липидных перекисей, характеризующихся гемолизом, миграцией креатинкиназы в периферическую кровь, расстройствами экзокринной функции поджелудочной железы и многими другими нарушениями в деятельности органов и систем организма.

Таблица 1

Содержание малонового диальдегида в эритроцитах белых крыс (в мкмМ/мл эритроцитарной массы) в контроле (I), при зеараленоновой интоксикации (II) и после лечения (III) на фоне изолированного применения ТСН (А), Са²⁺-дс-РНК (Б) и их сочетанного комбинированного действия (В)

Объект исследования		Больные				
		I	II	% разницы от I	III	% разницы от I
Эритроциты	А	109.9±2.90	189.7±3.10*	+73.0	149.8±3.10**	+36.0
	Б	111.0±2.10	199.3±3.70*	+80.0	143.1±2.90**	+30.0
	В	111.9±2.70	193.9±3.65*	+73.0	119.7±1.80***	+7.0

Примечание. А – n = 16; Б – n = 18; В – n = 20; эффекты антиоксидантов определялись на 20-25 дни болезни; *–P < 0.001, **–P < 0.01, ***–P < 0.5 (по сравнению с контролем).

Таблица 2

Содержание малонового диальдегида в эритроцитарной мембране белых крыс (в мМ/мг белка) в контроле (I), при зеараленоновой интоксикации (II) и после лечения (III) на фоне изолированного применения ТСН (А), Са²⁺-дс-РНК (Б) и их сочетанного комбинированного действия (В)

Объект исследования			Больные				
			I	II	% разницы от I	III	% разницы от I
Мембраны эритроцитов	А	а	4.6±0.412	9.9±0.89*	+115.0	7.8±0.55*	+69.0
		б	2.6±0.371	6.9±0.71*	+165.0	6.8±0.83*	+162.0
	Б	а	4.7±0.691	10.8±0.99*	+130.0	5.7±0.721***	+21.0
		б	2.4±0.711	6.0±0.71*	+150.0	4.4±0.72**	+83.0
	В	а	4.0±0.421	9.7±1.11*	+142.0	4.8±0.81***	+20.0
		б	2.2±0.892	6.5±0.69**	+190.0	3.0±0.45***	+36.0

Примечание. А – n = 15; Б – n = 25; В – n = 28; а) и б) обозначают выход малонового диальдегида соответственно в НАДФН- и аскорбат-зависимой системах; остальные обозначения те же, что и в табл. 1.

Примечательно, что, согласно нашим наблюдениям, активное состояние процесса СРО липидов в эритроцитах и МЭ сопровождается постепенным вовлечением в общий ГС организма наиболее чувствительных периферических органов.

На основании данных, отраженных в табл. 2, становится очевидным, что в МЭ интоксигированных животных интенсивность течения процессов СРО липидов оказывается несравненно более ускоренной, нежели в цельных эритроцитах и особенно в аскорбат-зависимой системе перекисления, что пока остается трудно объяснимым. Вместе с тем нарушения реакций перекисеобразования в МЭ поддаются коррекции с помощью примененных методов антиоксидантотерапии относительно быстрее и более демонстративно в ферментативной НАДФН-зависимой системе перекисления липидов. Этот факт мы склонны объяснить несравненно более высокой степенью чувствительности ферментных систем организма как к негативным воздействиям, так и к эффектам нормализующих факторов, принимающих участие, в частности, в процессах, регулирующих интенсивность течения реакций перекисеобразования в изученных нами биологических объектах.

Как показали результаты проведенных исследований, колебания количественного содержания МДА в изученных объектах оказались далеко не однотипными. Так, например, как явствует из табл. 1 и 2, уровень МДА как в эритроцитах, так и в МЭ с изолированным применением использованных терапевтических средств колебался в пределах достаточно высоких показателей. Иная картина прослеживалась в динамике содержания МДА у животных, в отношении которых был использован предложенный нами вариант комбинированной антиоксидантотерапии. Инъекции одного только ТСН сопровождалась

заметным сокращением разрыва между уровнями МДА в эритроцитах интоксцированных животных. Несмотря на эти положительные сдвиги, отмеченное расхождение продолжало оставаться статистически достоверным (** – $P < 0.01$), чувствительно превышая, таким образом, уровень перекисеобразования в контроле. Отмеченное выше сокращение разрыва между уровнями МДА у больных и здоровых белых крыс при введении ТСН становится еще более демонстративным, когда взамен ТСН давали Ca^{2+} -дс-РНК. Однако и в этом случае, хотя и проявлялось максимальное приближение количественного содержания МДА в эритроцитах животных с токсикозом к физиологическим уровням, расхождения оставались статистически достоверными. Наконец, результаты по изысканию наиболее результативных терапевтических мероприятий, направленных на достижение высокого лечебного эффекта с полным восстановлением характерного для нормально функционирующего организма уровня липидных перекисей в эритроцитах и МЭ, привели нас к идее одновременного применения указанных антиоксидантов. Как показали полученные данные, сочетанное использование ТСН и Ca^{2+} -дс-РНК приводит к почти полному восстановлению нормального уровня МДА в изученных биологических системах ($P < 0.5$). Идея об одновременном применении этих двух активных начал при зеараленоновой интоксикации возникла на основании данных [19,20] о важной синергической роли аскорбиновой кислоты в стабилизации и поддержании гидроксиформы α -токоферола как единственно активной разновидности этого витамина, наделенной антиоксидантными свойствами. Это в равной мере касается и примененных в настоящем исследовании сверхнизких доз ТСН и Ca^{2+} -дс-РНК как важнейших физиологически активных соединений антиоксидантного действия [21]. Действительно, как вытекает из результатов, приведенных в табл. 1, 2, именно сочетанная дача двух отмеченных соединений оказывается наиболее результативной в достижении эффекта лимитирования интенсивности течения перекисеобразовательного процесса в эритроцитах и МЭ при изучаемой патологии. По всей вероятности, предлагаемый нами метод комбинированной антиоксидантотерапии может оказаться весьма полезным и в снятии общего фона ГС, способствуя тем самым и повышению терапевтической эффективности использованных лечебных средств, а также достижению эффекта обратного развития нередко наблюдающихся дегенеративно-воспалительных поражений периферических органов, в частности поджелудочной железы [21-27].

Полученные результаты свидетельствуют о важном диагностическо-прогностическом значении при зеараленоновых отравлениях такого информативного показателя, каковым является перекисная резистентность эритроцитов. Благодаря ему сообщается принципиально новая и вполне адекватная информация относительно природы молекулярных механизмов патогенеза изученного болезненного состояния, основывающихся, в частности, на интенсификации реакций перекисеобразования в эритроцитах и МЭ.

Описанные расстройства в картине СРО липидов в ферментативной и неферментативной системах перекисления липидов, равно как и своеобразное усугубление ГС, развивающегося и генерализующегося в условиях изученной патологии, являются обязательными, но не специфическими факторами в сложном переплетении многочисленных патогенетических механизмов любого болезненного состояния.

Институт молекулярной биологии НАН

Литература

1. *Погосян Н.Р.* Свободнорадикальное окисление эритроцитарных липидов у больных атеросклерозом коронарных сосудов. Канд. дис. Ереван. 1981. 112 с.
2. *Карагезян К.Г., Геворкян Д.М.* - *Вопр. мед. химии.* 1989. Т. 5. С. 27-30.
3. *Бенисович В.И., Идельсон Л.И.* - *Вопр. мед. химии.* 1973. Т. 19. Вып. 6. С. 597-599.
4. *Владимиров Ю.А.* - *Биохимия.* 1966. Т. 31. N 5. С. 507-520.
5. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М. Наука. 1972. 250 с.
6. *Duggan D.D.* - *Arch. Biochem. Biophys.* 1959. V. 84. P. 116-118.
7. *Limber G., Davis R.T., Bekerman S.* - *Blood.* 1970. V. 36. N 1. P. 111-118.
8. *Lowry D.H., Rosenrough N.I., Farr A.L., Rahdall R.S.* - *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265-269.
9. *Карагезян К.Г.* - *Лаб. дело.* 1969. N 1. С. 3-6.
10. *Карагезян К.Г., Вартамян Г.С., Паносян А.Г.* - *Бюлл. exper. биол. и мед.* 1981. N 8. С. 35-37.
11. *Карагезян К.Г., Сафарян М.Д., Амадуни В.Г.* - *Журн. exper. и клин. мед.* 1980. N 1. С. 61-68.
12. *Карагезян К.Г., Овсепян Л.М., Адонц К.Г. и др.* - *Вопр. мед. химии.* 1982. N 5. С. 58-59.
13. *Карагезян К.Г., Бадалян Г.О., Данилова Л.Л., Ордян В.В.* - *Кровообращение.* 1986. N 3. С. 24-24.
14. *Карагезян К.Г., Овакимян С.С., Геворкян Э.М. и др.* - *Биоантиоксидант.* Черноголовка. 1986. Т. 2. С. 24-27.
15. *Мхитарян В.Г., Геворкян Д.М.* - *Биол. журн. Армении.* 1980. Т. 33. N 6. С. 611-620.
16. *Ерин А.И.* - *ДАН СССР.* 1983. Т. 273. N 2. С. 489-493.
17. *Ерин А.И.* - *Биохимия.* 1983. Т. 48. N 11. С. 1855-1861.
18. *Jutley J.R., Kelleher J., Bremmen T.G., Denyer M.E., Mitchell C.J.* - *Gut.* 1988. V. 29. N 8. P. 1093-1097.
19. *Boyd E.J.S., Wormsley K.G.* - *Int. J. Pancreatol.* 1988. V. 3. N 2-3. P. 101-103.
20. *Neiderau C., Crass K.A., Silver G., Ferrell L.D., Grendell J.H.* - *Gastroenterology.* 1988. V. 95. N 6. P. 1648-1657.
21. *Едоян А.Р.* Специфика корректирующего действия сверхнизких доз факторов химической и физической природы при нарушениях метаболизма фосфолипидов у белых крыс с моделированным аллоксаном сахарным диабетом. Канд. дис. Ереван. 2004. 145 с.
22. *Kelemen D., Tццк В.* - *Sebeszet.* 1988. V. 41. N 2. P. 73-82.
23. *Inoue K., Hosotani R., Tatemoto K., Yajima H., Tobe T.* - *Dis. Sci.* 1988. V. 33. N 7. P. 828-832.
24. *Lesi C., Merli D'Eril G.V., Scotta M.S., Zoni L., Malaguti P.* - *Int. J. Pancreatol.* 1988. V. 3. N 2-3. P. 201-208.
25. *Robert J.H., Toledano A.E., Huang G., Toth L.S., Premus G., Papp M., Dreiling D.A.* - *Mt Sinai J. Med.* 1988. V. 55. N 5. P. 365-368.
26. *Schulz I., Ullrich K., Frumter E. e.a.* - *Pbl. Arch. Ges. Physiol.* 1965. V. 284. P. 360-363.
27. *Mangos J. e.a.* - *Science.* 1967. V. 158.

Մ. Կ. Ղարազրոզյան

Զեարալենոնային թունավորումների ժամանակ հիպոքսիկ սինդրոմի ազդեցության առանձնահատկությունները պերօքսիդային հեմոլիզի վերաբերյալ էրիթրոցիտների դիմադրողականության խախտումների ձևավորման մեխանիզմների վրա և ֆիզիոլոգիական ակտիվ միացությունների գերցածր քանակների կանոնավորիչ դերը

Զեարալենոնային թունավորումների ժամանակ սպիտակ առնետների արյան էրիթրոցիտներում և նրանց թաղանթներում արձանագրվում են լիպիդների ազատ ռադիկալային ռեակցիաների արագացման վառ արտահայտված տեղաշարժեր: Վերջիններս պայմանավորված են նշված պրոցեսի վերջնական նյութի՝ մալոնային դիալդեհիդի քանակի զգալի ավելացմամբ ուսումնասիրված օբյեկտներում ինչպես NADP-H և առավելևս ասկորբատ-կախյալ գերօքսիդացման համակարգերում:

Հակաօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված նատրիումի թիոսուլֆատի և սնկային ցածր մոլեկուլային երկպարուրային ՌՆԹ-ի կալցիումական ածանցյալի գերցածր քանակների ($10^{-12}M$) ազդեցության ներքո հայտնաբերված է վերը նշված լիպիդային գերօքսիդների առաջացման պրոցեսի արագացման անկման փաստ, որը զուգորդվում է մալոնային դիալդեհիդի քանակության նվազմամբ, չհասնելով, սակայն, կոնտրոլ ցուցանիշների մակարդակին: Վերջինս հաջողվեց արձանագրել միայն նշված նյութերի համատեղ օգտագործման պայմաններում: