

Активирование свободнорадикального окисления липидов как тяжелое осложнение в клинике гипогликемического синдрома у детей малолетнего возраста и экспериментальных животных с моделированной инсулином гипогликемией

О.К. Бдоян

*Медицинский центр «Сурб Аствацамайр»,
Институт молекулярной биологии НАН РА
0014, Ереван, ул. Асратяна, 7*

Ключевые слова: фосфолипиды, малоновый диальдегид, гипогликемия

Согласно имеющейся научной информации [13], формирование патогенетических механизмов при различных болезненных состояниях организма во многом обусловлено качественно-количественными расстройствами эндогенного альфа-токоферола (α -Т) как основного фактора антирадикальной защиты клетки. Высказанные соображения в равной степени касаются и осложнений, проявляющихся в клинике гипогликемического синдрома (ГС) у детей малолетнего возраста (3 мес. – 4 года), значительно участвовавшего в последнее время, по сообщениям ВОЗ.

Исходя из вышеизложенного, были сформированы цели и задачи настоящего исследования в плане проведения специальных наблюдений на уровне мембран эритроцитов (МЭ) крови малолетних детей и экспериментальных белых крыс. Изучение особенностей нарушения у них интенсивности течения свободнорадикального окисления (СРО) липидов в ферментативной (НАДФ-Н₂-зависимой-НЗП) и неферментативной (аскорбат-зависимой-АЗП) системах перекисеобразования [2] в направлении выявления расстройств резистентности эритроцитов к перекисному гемолизу (РЭПГ) как одному из главных осложнений [1,10,12], развивающихся при ГС, заслуживает особого внимания. Это тем более примечательно и важно при выборе тиосульфата натрия (ТСН) в качестве наиболее эффективного средства антиоксидантного действия [3-7,9,14,15,17,19].

Материал и методы

Исследования проводили на 81 пробе крови малолетних детей с ГС и 38 белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г, содержащихся в обычных условиях вивариях и голодавших перед началом экспериментов в течение 12 ч. Внутривенное введение инсулина в количестве 15 мл/массу тела производили проколом шприца по биссектрисе угла венозного расширения, образованного верхней полой и подключичной венами при крестообразной фиксации белых крыс на станках для мелких животных. Забор крови производили из указанной области через 30 и 60 мин после внутривенной инъекции инсулина.

МЭ выделяли по методу, описанному Лимбер [18]. К 4,5 мл крови прибавляли 0,5 мл 1,5 % раствора оксалата натрия, тщательно перемешивали, центрифугировали 15 мин при 1000 г на рефрижераторной центрифуге К-23. Плазму сливали, осадок (эритроцитарную массу) – дважды промывали изотоническим раствором NaCl с последующим центрифугированием и затем суспендировали в буферном растворе (0,01 M NaHCO₃, 0,003 M NaCl) с ЭДТА в соотношении 1:5 и центрифугировали при 12000 g на рефрижераторной центрифуге К-24 в течение 40 мин. Надосадочную жидкость сливали и осадок дважды промывали буфером без ЭДТА, центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин. Процедуру повторяли два раза, последний раз с использованием буфера трис-HCl, pH 7,2.

МЭ переносили в фарфоровую ступку, добавляли 2-5-20 мл ацетона, содержимое тщательно растирали с помощью пестика и сушили под током холодного воздуха до образования сухого остатка [1, 1]. Экстракцию ФЛ и их количественное определение производили по Фолчу [16]. Фракционирование индивидуальных ФЛ проводили методом тонкомерной восходящей тонкослойной хроматографии с использованием системы растворителей оплороформ-метанол-аммиак (65:35:5). Экстракты эцетоновых порошков наносили на пластины в трех точках, удаленных от нижнего края пластины на 2 мм. Пластины высушивали на воздухе и окрашивали в парах йода. Пятна ФЛ желтого цвета идентифицировали с помощью соответствующих стандартных свидетелей (Sigma). После элюирования

подкисленным метанолом элюаты выпаривали досуха и сжигали в среде серной и азотной кислот для минерализации органического фосфора, количественное определение которого производили по измерению оптической плотности синего окрашивания раствора, развивающегося в результате инкубирования его в присутствии молибденово-кислого аммония и витамина С при 37°C в течение 1,5 ч. После охлаждения пробы фотометрировали на СФ-26 при длине волны 830 нм [8].

Результаты и обсуждение

Как показали результаты проведенных исследований, отраженные в табл. 1, в цельной крови малолетних детей с ярко выраженным ГС отме-

Таблица 1

Количественное содержание малонового диальдегида (в нМ/мг белка) в НАДФ.Н₂- и аскорбатзависимой системах перекисления липидов в цельной крови детей малолетнего возраста с гипогликемическим синдромом

Показатели	Контроль, практически здоровые малолетние	Малолетние с гипогликемическим синдромом	% разницы от контроля	Тиосульфат натрия					
				10 ⁻⁶ М	% разницы от контроля	10 ⁻⁹ М	% разницы от контроля	10 ⁻¹² М	% разницы от контроля
НАДФ.Н ₂ -зависимая система перекисления	4,43 ± 0,21	5,94 ± 0,22*	+34,08	5,59 ± 0,21*	+26,19	5,17 ± 0,27*	+16,70	4,51 ± 0,26**	+6,32
Аскорбатзависимая система перекисления	5,67 ± 0,27	7,89 ± 0,25*	+39,15	7,28 ± 0,22*	+28,40	6,73 ± 0,22*	+18,69	6,07 ± 0,27**	+7,08

Примечание. n=81; * - P<0,001; ** - P<0,0; без обозначений - расхождения от контроля статистически не достоверны.

Таблица 2

Количественное содержание малонового диальдегида (в нМ/мг белка) в НАДФ.Н₂- и аскорбатзависимой системах перекисления липидов в мембранах эритроцитов крови детей малолетнего возраста с гипогликемическим синдромом

Показатели	Контроль, практически здоровые малолетние	Малолетние с гипогликемическим синдромом	% разницы от контроля	Тиосульфат натрия					
				10 ⁻⁶ М	% разницы от контроля	10 ⁻⁹ М	% разницы от контроля	10 ⁻¹² М	% разницы от контроля
НАДФ.Н ₂ -зависимая система перекисления	4,43 ± 0,21	5,94 ± 0,22*	+34,08	5,59 ± 0,21*	+26,19	5,17 ± 0,27*	+16,70	4,51 ± 0,26**	+6,32
Аскорбатзависимая система перекисления	5,67 ± 0,27	7,89 ± 0,25*	+39,15	7,28 ± 0,22*	+28,40	6,73 ± 0,22*	+18,69	6,07 ± 0,27**	+7,08

Примечание. n=81; обозначения те же, что и в табл.1

чается чувствительное активирование СРО липидов. Последнее расценивается как интенсивно совершающийся процесс вовлечения освобождающихся при деацелировании фосфолипидов (ФЛ) под действием фосфолипазы A_2 (ФЛ A_2) жирных кислот (ЖК) полиенового ряда в реакции перекисобразования особенно в АЗП. Аналогичная

картина в более выраженной форме прослеживается и в МЭ, как это отражено в табл. 2. Отмеченные закономерности были зарегистрированы и в экспериментах на беспородных белых крысах-самцах с моделированной инсулином гипогликемией, согласно данным, приведенным в табл. 3.

Таблица 3

Динамика изменений количества малонового диальдегида (в нМ/мг белка) в НАДФ. H_2 - и аскорбатзависимых системах перекисления липидов в мембранах эритроцитов крови белых крыс в различные периоды развития гипогликемического синдрома, моделированного инсулином

Показатели	Контроль, без введения физ. раствора	Контроль, с введением физ. раствора	ИНСУЛИН			
			30 мин	% разницы от контроля	60 мин	% разницы от контроля
НАДФ. H_2 -зависимая система перекисления	$2,93 \pm 0,26$	$2,96 \pm 0,24$	$3,99 \pm 0,27^*$	+36,18	$5,65 \pm 0,22^*$	+92,83
Аскорбатзависимая система перекисления	$3,42 \pm 0,25$	$3,49 \pm 0,27$	$5,86 \pm 0,29^*$	+71,35	$7,97 \pm 0,26$	+133,05

Примечание. $n=81$; обозначения те же, что и в табл. 1

Примечательно, что по результатам исследований, отраженным в табл. 4, степень эффективности антиоксидантного действия в опытах *in vivo*

сверхнизких концентраций ТСН является отчетливым отражением ее дозо- и времязависимости.

Таблица 4

Динамика изменений количества малонового диальдегида (в нМ/мг белка) в НАДФ. H_2 - и аскорбатзависимых системах перекисления липидов в мембранах эритроцитов крови белых крыс спустя 24 после однократного внутривенного введения им 1 мл тиосульфата натрия $10^{-6}M$, $10^{-9}M$ и $10^{-12}M$ на фоне гипогликемии, моделированной инсулином

Промежутки времени	Контроль, без введения физ. раствора	Контроль, с введением физ. раствора	Гипогликемия после введения инсулина	Тиосульфат натрия		
				10 ⁻⁶ М	10 ⁻⁹ М	10 ⁻¹² М
НАДФ.Н ₂ - зависимая система перекисления						
30 мин	2,87 ± 0,22	2,89 ± 0,26	3,79 ± 0,25*	3,50 ± 0,27 ^{xx}	3,23 ± 0,28 ^{xx}	2,96 ± 0,27
60 мин	2,93 ± 0,22	2,86 ± 0,12	4,95 ± 0,25*	4,85 ± 0,25*	4,01 ± 0,24	3,17 ± 0,26 ^{xx}
Аскорбатзависимая система перекисления						
30 мин	3,61 ± 0,27	3,62 ± 0,24	5,48 ± 0,22	5,46 ± 0,28*	4,28 ± 0,26*	3,79 ± 0,26
60 мин	4,01 ± 0,22	4,09 ± 0,29	7,49 ± 0,28	6,09 ± 0,25*	5,01 ± 0,27	4,20 ± 0,28

Примечание. $n=36$; обозначения те же, что и в табл. 1

Согласно данным табл. 5, по нашим неоднократным наблюдениям наиболее высокий уровень антиоксидантного действия проявляется при испытании самой низкой концентрации ТСН – 10^{-12} М при 4-часовой ее экспозиции в инкубационной среде трис-НСI буфера (37°C, pH 7,4). Для исключения возможного побочного действия одного только ТСН в специальной серии исследований на

интактных животных были изучены особенности изолированного действия указанных концентраций ТСН. Как оказалось, они не сопровождаются сколько-нибудь заметными статистически достоверными отклонениями интенсивности течения перекисеобразовательного процесса, отчетливо приведенными в табл.6.

Таблица 5

Динамика изменений количества малонового диальдегида (в нМ/мг белка) в НАДФ. H_2 - и аскорбатзависимой системах перекисления липидов в мембранах эритроцитов крови белых крыс с 60-минутным инсулиномодулированным гипоксическим синдромом и эффекты (1) 2- и (2) 4-часовой инкубации их в буферной системе в присутствии сверхнизких доз ТСН

Показатели	Контроль, с введением физ. раствора	Инсулин	Тиосульфат натрия		
			10^{-6} М	10^{-9} М	10^{-12} М
1 НАДФ. H_2 - зависимая система перекисления	$3,29 \pm 0,67$	$7,87 \pm 0,66^*$	$6,41 \pm 0,66^*$	$5,69 \pm 0,65^{**}$	$5,43 \pm 0,66^{**}$
Аскорбатзависимая система перекисления	$5,88 \pm 0,66$	$9,98 \pm 0,67^*$	$9,06 \pm 0,63^*$	$8,53 \pm 0,59^*$	$7,06 \pm 0,63^{**}$
2 НАДФ. H_2 - зависимая система перекисления	$4,98 \pm 0,69$	$7,98 \pm 0,64^*$	$6,79 \pm 0,61$	$6,02 \pm 0,63$	$5,27 \pm 0,68$
Аскорбатзависимая система перекисления	$6,89 \pm 0,61$	$9,9 \pm 0,68^*$	$8,69 \pm 0,66$	$7,37 \pm 0,63$	$6,41 \pm 0,63$

Примечание. $n=36$; обозначения те же, что и в табл. 1

Таблица 6

Динамика изменений количества малонового диальдегида (в нМ/мг белка) в НАДФ. H_2 - и аскорбатзависимой системах перекисления липидов в мембранах эритроцитов крови интактных белых крыс после внутривенного введения им 1 мл тиосульфата натрия в концентрации 10^{-6} М, 10^{-9} М и 10^{-12} М

Промежутки времени	Контроль, без введения физ. раствора	Контроль, с введением физ. раствора	Тиосульфат натрия		
			10 ⁻⁶ М	10 ⁻⁹ М	10 ⁻¹² М
НАДФ.H ₂ - зависимая система перекисления					
30 мин	2,87 ± 0,26	2,89 ± 0,22	2,85 ± 0,22	2,88 ± 0,24	2,88 ± 0,22
60 мин	2,89 ± 0,24	2,86 ± 0,19	2,88 ± 0,22	2,84 ± 0,22	2,87 ± 0,24
Аскорбатзависимая система перекисления					
30 мин	3,46 ± 0,28	3,68 ± 0,28	3,47 ± 0,27	3,48 ± 0,26	3,45 ± 0,28
60 мин	3,49 ± 0,28	3,87 ± 0,23	3,40 ± 0,21	3,38 ± 0,25	3,40 ± 0,29

Примечание. $n=36$; без обозначений дозо- и времязависимые расхождения содержания МДА в обеих системах перекисления статистически не достоверны

Как вытекает из приведенных результатов, во всех случаях уровень конечного продукта окисления липидов – малонового диальдегида колеблется в пределах контрольных величин, что свидетельствует об отсутствии побочного действия ТСН на стабилизированный в норме уровень перекисей. Являясь мощным синергистом α -Т, ТСН

оказывает всяческое воздействие на поддержание существующего в физиологических условиях динамического равновесия между про- и антиоксидантными системами организма. Подтверждением высказанных соображений можно признать результаты последующих серий исследований, отраженные в табл. 6. и посвященные изучению количест-

Таблица 7

Динамика изменений количества малонового диальдегида (в нМ/мг белка) в НАДФ.Н₂ - и аскорбатзависимой системах перекисления липидов в мембранах эритроцитов крови белых крыс в различные промежутки времени после введения им инсулина на фоне предшествовавшей внутривенной инъекции 1 мл 10⁻¹²М тиосульфата натрия

Промежутки времени	Контроль, без введения физ. раствора	Контроль, с введением физ. раствора	Тиосульфат натрия 10 ⁻¹² М	Инсулин
НАДФ.Н ₂ - зависимая система перекисления				
30 мин	2,87 ± 0,26	2,97 ± 0,25	3,21 ± 0,25	2,88 ± 0,23
60 мин	3,09 ± 0,23	2,95 ± 0,29	3,40 ± 0,27	3,03 ± 0,27
Аскорбатзависимая система перекисления				
30 мин	3,67 ± 0,23	3,68 ± 0,26	3,89 ± 0,25	3,63 ± 0,25
60 мин	4,23 ± 0,26	3,98 ± 0,25	4,20 ± 0,25	3,97 ± 0,26

Примечания. n=36; обозначения те же, что и в табл. 6

венных колебаний МДА в МЭ экспериментальных животных, предварительно инъецированных ТСН перед выработкой у них инсулинзависимого ГС. Как вытекает из данных, приведенных в табл. 7, спустя 30 и особенно 60 мин после инъекции белым крысам инсулина на этом фоне не имеет места развитие характерного для инсулинмоделированного ГС четко проявляющегося активирования

СРО липидов свыходом значительных концентраций МДА, что является показателем развивающегося в условиях действия ТСН стабилизированного статуса антиоксидантной системы эндогенных механизмов антирадикальной защиты клетки и биологических систем организма в целом.

Поступила 04.07.07

Լիպիդների ազատառիկայալի մոնիթորինգը օրգանիզմում և օրգանիզմում փոքր տարիքի երեխաների հիպոլիպեմիկ համախտանշանի կլինիկայում և փորձարարական կենդանիների իմունոլոգիկ մոնիթորինգը հիպոլիպեմիկ պայմաններում

Հ.Կ. Բոլոյան

Յույց է տրված, որ փոքր տարիքի երեխաների մոտ հիպոլիպեմիկ համախտանշանի պայմաններում ի հայտ են գալիս ծանր բարդությունների շարքին պատկանող ճարպերի ազատառիկայալի պրոցեսների իմունոսիվության

փոփոխություններ: Վերջիններս բնորոշվում են երեխաների արյան էրիթրոցիտների թաղանթներում և ամբողջական արյան մեջ մալոնային դիալդեհիդի քանակի զգալի աճով՝ մի բան, որ լուրջ վտանգ է հանդիսանում նշված նյութի

առաջանալիս և բաղաձայնիկ հատկությունների շնորհիվ: Օգտագործելով մատրիումի թիոսուլֆատի գերցածր քանակները (10^{-6}M , 10^{-9}M , 10^{-12}M) in vitro և in vivo պայմաններում, առաջանալիս են նշված ֆիզիոլոգիայի ակտիվ միացության վառ արտահայտված հակաօքսիդանտային հատկությունների առանձնահատկությունները: Վերջիններս արտահայտված են լիպիդային գերօքսիդների քանակական ինվազմամբ ուսումնասիրված կենսաբանական գործընկերներում, հասնելով նորմալ պայմաններում

ընդհանուր արժանագրված մակարդակների սահմաններին: Նշված մյուսի հակաօքսիդանտային արդյունավետության առավել բարձր աստիճանը արժանագրվում է նրա ամենացածր 10^{-12}M քանակի օգտագործման ժամանակ: Ստացված արդյունքները լուրջ հիմք են հանդիսանում մատրիումի թիոսուլֆատի գերցածր քանակների կիրառման համար՝ որպես հիպոգլիկեմիկ տարբեր ծագում ունեցող ախտաբանական վիճակների շտկման առավել արդյունավետ քերականիկ միջոց:

Activation of free radical lipid oxidation as a grave complication in the clinical picture of hypoglycemic syndrome in children of early age and in experimental animals with insulin-modulated hypoglycemia

H.K. Bdoyan

The data obtained have shown that hypoglycemic syndrome of small children and experimental albino rats with insulin-modulated hypoglycemia is accompanied by significant abnormalities of peroxide formation processes. These changes are characterized by a pronounced increase in malonic dialdehyde concentration in whole blood and erythrocyte membranes, which is a very serious abnormality leading to manifestations of membranotoxic, membranolytic action. Using

of ultra low doses (10^{-6}M , 10^{-9}M and 10^{-12}M) of sodium thiosulfate was characterized by normalization of the quantity of lipid peroxides in biological substances studied. This effect was more pronounced in case of the smallest dose (10^{-12}M) of sodium thiosulfate.

The results of the investigation serve as a basis for recommendation of the preparation for application in the clinic of hypoglycemic syndrome of various etiology.

Литература

1. Бдоян О.К., Едоян Л.В., Казарян А.В., Карагезян К.Г. Особенности качественно-количественных изменений фосфолипидов в эритроцитарной массе и мембранах эритроцитов белых крыс с инсулиновой гипогликемией. Мед. наука Армении НАН РА, 2006, т. XLVI, 1, с. 44-47.
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах/Под ред. Г.М. Франка. М., 1972.
3. Едоян А.Р., Карян Ш.С., Едоян Л.А. и др. Эффекты сочетанного применения сверхмалых доз кальциевого преципитата дрожжевой низкомолекулярной двуспиральной РНК с тиосульфатом натрия на метаболизм жирных кислот головного мозга белых крыс с аллоксановым диабетом. Мат. VII ежегодной научной сессии Академии мед. наук Республики Армения. «Современные вопросы сахарного диабета». Ереван, 2003.
4. Едоян А.Р., Овакямян С.С., Амирханян Л.Т. и др. Комбинированная антиоксидантотерапия как эффективный регулятор нарушений тканевых процессов фосфолипидного метаболизма при сахарном диабете в эксперименте. I Всероссийская конференция по иммунотерапии. Сочи, 2003, т.5, 1.
5. Едоян Л.В., Аганянц М.А., Астабатьян М.А. и др. Лазерное облучение сверхнизкой интенсивности при нарушениях гликолипидного обмена у аллоксандиабетических белых крыс. XI Международная конференция по химии органических и элементоорганических пероксидов. Москва, 2003.
6. Едоян Л.В., Карян Ш.С., Амирханян О.М. и др. Особенности нарушений процессов свободнорадикального окисления липидов в митохондриях аллоксандиабетических белых крыс и пути их эффективного корригирования применением сверхмалых доз Ca^{2+} -до-РНК. I Всероссийская конференция по иммунотерапии. Сочи, 2003, т.5, 1.
7. Едоян А.Р. Специфика корригирующего действия сверхнизких доз факторов химической и физической природы при нарушениях метаболизма фосфолипидов у белых

- крыс с моделированным аллоксаном сахарным диабетом. Автореф. дис. Ереван, 2004.
8. Зубер В.Л. Методы исследования фосфолипидов. В. кн.: Методы биохимических исследований. Л., 1982.
 9. Казарян А.В. Особенности структурных изменений фосфолипидов головного мозга белых крыс с сахарным диабетом, моделированным аллоксаном. Изд. Международной конференции "Ломоносов-2005", Москва, 2005.
 10. Казарян А.В., Овакимян С.С., Секоян Э.С., Карагезян К.Г. Особенности антикоагулянтных свойств вновь синтезированных препаратов кумаринового ряда. ДНАН РА, 2006, т. 106, 1, с. 72-79.
 11. Карагезян К.Г. Методика качественного и количественного определения фосфолипидов цельной крови, плазмы, сыворотки и цереброспинальной жидкости у собак. Лаб. дело, 1969, 1, с. 23-26.
 12. Карагезян К.Г., Бдоян О.К., Казарян А.В., Овакимян С.С. Специфика функциональной активности метаболизма гликогена в биологических системах белых крыс с сахарным диабетом, моделированным аллоксаном. Мед. наука Армении НАН РА, 2006, т. XLVI, 2, с. 3-7.
 13. Мартirosян А.А., Казарян А.В., Секоян Э.С. и др. Специфика корректирующего действия ультрафиолетового облучения при нарушениях резистентности эритроцитов к перекисному гемолизу у белых крыс с сахарным диабетом, моделированным аллоксаном. Аллергология и иммунология, Афины, 2005, т. 6, 3, с. 368.
 14. Матинян Г.В. Функциональные изменения печени и лечебное действие тиосульфата натрия при хлоропреновом отравлении. Изв. АН АрмССР, 1959, т. 12, 6, с. 33-42.
 15. Матинян Г.В. Действие хлоропрена и тиосульфата натрия на активность орнититранскарбамилазы и карбамилфосфатсинтетазы. Биол. журн. Армении, 1968, т. 21, 9, с. 22-29.
 16. Folch J., Lees M., Sloane-Stane G. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues, J. Biol. Chem., 1957, 226, p. 497-509.
 17. Ghazaryan A.V., Hovsepyan L.M., Karagezyan K.G. Specificities of phospholipids metabolism in rat brain tissue under the conditions of diabet mellitus, modulated by alloxan, Iranian Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Iran, 2005, p. 31.
 18. Limber G.R., Davie R.F., Haker A.M.S. Acrylamide gel electrophoresis studies of human erythrocyte membrane, Blood, 1970, 36, 2, p. 111-118.
 19. Karagezyan K.G., Ktsoyan Zh.A., Ghazaryan A.V., Elbakyan G.V., Sarkisyan N.N., Khachatryan Z.A., Arakelova K.A., Manukyan G.P., Kazaryan K.A., Sedrakyan A.M., Hovhanessyan A.I., Tatyana M.V. Lysophosphatidilcholines of blood as an possible ethiopathogenic factor at familial mediteranean fever (periodic disease), International J. on Immunorehabilitation, Athens, 2005, 7, 2, p. 102.