

Особенности количественных изменений малонового диальдегида в мембранах эритроцитов лиц с ранними и поздними гестозами

А.Г. Петросян, М.К. Карагезян, Г.А. Кеворкян, К.Г. Карагезян, А.В. Казарян

Центр перинатологии, акушерства и гинекологии МЗ РА

Институт тонкой органической химии им. А.Л. Минцгойна Научно-технологического центра органической и лекарственной химии НАН РА

0014, Ереван, пр. Азатутян, 26

Ключевые слова: гестозы, фосфолипиды, свободнорадикальное окисление

Молекулярные механизмы гиперплазий эндометрия так называемых гестозов различных уровней выраженности по сей день остаются мало изученными по части патометаболических расстройств, главным образом нарушений реакций липидного обмена, особенно метаболизма фосфолипидов (ФЛ) и интенсивности течения процессов свободнорадикального окисления (СРО) липидов. Согласно некоторым указаниям литературы [2,3], они в известной степени связываются с имеющими место расстройствами иммунологического статуса, специально акцентируемого при оценке этиопатогенетических механизмов развития акушерско-гинекологических болезненных состояний организма [4,14,17,18,20]. При анализе отмеченных клинических отклонений особое внимание уделяется вредоносному действию продуктов перекисления неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК), освобождающихся в высоких концентрациях при деацилировании ФЛ-глицеридов, преимущественно фосфатидилхолинов (ФХ) или так называемых лецитинов, катализируемом чрезмерно активированным ферментом – фосфолипазой A_2 [1,5,13,15,16]. Изучение качественно-количественных изменений липидных перекисей и главным образом конечного продукта процесса СРО НЭЖК – малонового диальдегида (МДА) при гестозах различных уровней выраженности как в ферментативной (NADP.H₂-зависимой (НЗП), так и в неферментативной – аскорбатзависимой (АЗП) системах

перекисления НЭЖК стало предметом наших специальных исследований в настоящей работе.

Материал и методы

Мембраны эритроцитов (МЭ) выделяли по методу Лимбера [19] прибавлением к 4,5 мл крови 0,5 мл 1,5% раствора оксалата натрия, тщательным перемешиванием смеси, ее центрифугированием 15 мин при 1000 г на рефрижераторной центрифуге К-23. Осадок (эритроцитарную массу) – дважды промывали изотоническим раствором NaCl с последующим центрифугированием, суспендированием в буферном растворе (0,01 M NaHCO₃, 0,003 M NaCl) с ЭДТА в соотношении 1:5 и центрифугированием при 12000 г на рефрижераторной центрифуге К-24 40 мин. Образовавшийся осадок дважды промывали буфером без ЭДТА и вновь центрифугировали при 12000 г 30 мин, процедуру повторяли дважды, последний раз с использованием буфера трис-HCl, pH 7,2.

Метод определения МДА основан на реакции между МДА и тиобарбитуровой кислотой (ТБК), протекающей при высокой температуре и кислых значениях pH. С отмеченной целью суспензию мембран инкубировали: 1) в случае изучения интенсивности течения перекисеобразовательного процесса в ферментативной (NADP.H₂-зависимой) системе в смеси общим объемом в 1 мл, состоящей из 0,1 мл суспензии мембран, 0,3 мл 12×10^{-4} M соли Мора, 0,3 мл 2×10^{-4} M пирогосфа-

та, 0,3 мл 1 мМ р-ра NADP. H₂; 2) в случае же изучения интенсивности течения перекисеобразовательного процесса в неферментативной (аскорбатзависимой) системе – в смеси, состоящей из 0,1 мл суспензии мембран, 0,3 мл 40 мМ трис-НСl (рН 7,4), 0,3 мл 0,8 мМ р-ра аскорбиновой кислоты, 0,3 мл 12 × 10⁻⁶ М соли Мора. Инкубацию проводили в водяной бане при 37°C в течение 30 мин при постоянном встряхивании содержимого пробирок. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 30% р-ра трихлоруксусной кислоты, осадок удаляли центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 мин, смесь надосадочной жидкости и ТБК нагревали при 100°C в течение 10 мин, интенсивность развивающейся окраски розового хромогена, прямо пропорциональную концентрации МДА, измеряли спектрофотометрически при длине волны 535 нм, по формуле

$$C = D / \Sigma l,$$

где D – показатель спектрофотометра, Σ – коэффициент молярной экстинкции, l – данные кюветы (1

см). Интенсивность течения процесса СРО липидов выражали в нМ МДА/мг белка данной фракции.

Достоверность полученных результатов определяли методом десятичной вариационной статистики Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Как вытекает из данных, приведенных в табл. 1, интенсивность течения процесса СРО липидов в МЭ оказывается значительно выше в АЗП-зависимой системе перекисеобразования, чем это имеет место в НЗП-зависимой системе. Изучение особенностей количественных сдвигов МДА в МЭ крови лиц с ранними и поздними гестозами позволило установить факт закономерно повторявшегося доминирования скорости течения процесса СРО НЭЖК как в НЗП-, так и, особенно, в АЗП-зависимой системе при поздних гестозах.

Таблица 1

Количественные изменения малонового диальдегида (в нМ/мг белка) в NADP.H₂- и аскорбатзависимых системах перекисления липидов в мембранах эритроцитов лиц с ранними и поздними гестозами

Показатели	Контроль (практически здоровые)	Ранние гестозы	% разницы от контроля	Поздние гестозы	% разницы от контроля
NADP.H ₂ - зависимая система перекисления	2,99±0,26	6,11±0,29*	+104,3	8,89±0,31*	+197,3
Аскорбатзависимая система перекисления	3,57±0,29	7,79±0,33*	+118,2	10,99±0,34*	+207,8

Примечание. n=16; *P<0,001

Примечательно при этом отсутствие скольких-нибудь заметных отклонений в уровне МДА в МЭ как в ферментативной, так и неферментативной системе процесса СРО НЭЖК в результате 60-

минутной инкубации их в буферной системе при отсутствии в ней физиологически активного начала (табл.2).

Таблица 2

Динамика количественных изменений малонового диальдегида (в нМ/мг белка) в $NADP.H_2$ - и аскорбатзависимой системах перекисления липидов в мембранах эритроцитов лиц с ранними и поздними гестозами до (фиксированный контроль) и после 60 мин инкубации в системе трис- HCl буфера (при $T 37^\circ C$, $pH 7,4$)

Показатели	Ранние гестозы			Поздние гестозы		
	до инкубации (фиксированный контроль)	после инкубации	% разницы от контроля	до инкубации (фиксированный контроль)	после инкубации	% разницы от контроля
$NADP.H_2$ -зависимая система перекисления	$2,67 \pm 0,23$	$2,61 \pm 0,22^{xxx}$	-2,25	$8,29 \pm 0,33$	$8,51 \pm 0,31^{xxx}$	+197,3
Аскорбатзависимая система перекисления	$3,51 \pm 0,27$	$3,59 \pm 0,29^{xxx}$	+2,28	$9,99 \pm 0,37^*$	$10,69 \pm 0,36^{xxx}$	+207,8

Примечание. $n=16$; $^{xxx}P>0.5$

Последующее развитие исследований протекало в направлении изучения особенностей действия тиосульфата натрия (ТСН) в сверхнизких концентрациях различных степеней выраженности ($10^{-6}M$, $10^{-9}M$, $10^{-12}M$) в той же буферной системе. Согласно результатам проведенных наблюдений, отраженных в табл. 3, эффекты ТСН характеризуются его отчетливо проявляющимся нормализующим действием на расстроенные стороны перекисеобразовательного процесса в МЭ лиц, страдающих ранними и поздними гестозами,

причем в большей степени при использовании наименьшей из примененных концентраций ТСН ($10^{-12}M$). Вместе с тем % разницы в уровне МДА в МЭ после их 2-часовой инкубации в системе трис- HCl буфера ($T 37^\circ C$, $pH 7,4$) при всех трех использованных конечных концентрациях ТСН оказался статистически не достоверным, что свидетельствовало об упорядочении интенсивности течения процесса перекисеобразования до физиологически приемлемых пределов, регистрируемых в контроле (табл. 3,4).

Таблица 3

Динамика количественных изменений малонового диальдегида (в нМ/мг белка) в $NADP.H_2$ - и аскорбатзависимой системах перекисления липидов в мембранах эритроцитов лиц с ранними гестозами при 2 ч инкубации их в системе трис- HCl буфера ($T 37^\circ C$, $pH 7,4$) в присутствии сверхнизких (конечных) концентраций тиосульфата натрия ($10^{-6}M$, $10^{-9}M$ и $10^{-12}M$)

Показатели	Контроль (практически здоровые)	Ранние гестозы	% разницы от контроля	Тиосульфат натрия					
				$10^{-6}M$	% разницы от контроля	$10^{-9}M$	% разницы от контроля	$10^{-12}M$	% разницы от контроля
$NADP.H_2$ -зависимая система перекисления	$2,93 \pm 0,27$	$5,99 \pm 0,28^*$	-104,4	$3,23 \pm 0,29^{xx}$	+13,65	$3,23 \pm 0,29^{xxx}$	+5,12	$8,71 \pm 0,28^{xxx}$	+1,37
Аскорбатзависимая система перекисления	$3,49 \pm 0,29$	$7,67 \pm 0,31^*$	+119,77	$3,23 \pm 0,29^{xx}$	+5,44	$3,59 \pm 0,29^{xxx}$	+2,87	$3,51 \pm 0,29^{xxx}$	+0,57

Примечание. $n=16$; обозначения те же, что и в табл. 1 и 2, $^{xx}P<0.01$

Динамика количественных изменений малонового диальдегида (в нМ/мг белка) в NADP.H₂- и аскорбатзависимой системах перекисления липидов в мембранах эритроцитов лиц с поздними гестозами при 2 ч инкубации их в системе трис-HCl буфера (Т 37°C, pH 7,4) в присутствии сверхнизких (конечных) концентраций тиосульфата натрия (10^{-6} М, 10^{-9} М и 10^{-12} М)

Показатели	Контроль (практически здоровые)	Поздние гестозы	% разницы от контроля	Тиосульфат натрия					
				10^{-6} М	% разницы от контроля	10^{-9} М	% разницы от контроля	10^{-12} М	% разницы от контроля
NADP.H ₂ -зависимая система перекисления	2,73±0,27	8,37±0,33 ^х	+206,59	2,99±0,29 ^{хх}	+9,52	2,88±0,29 ^{ххх}	+5,49	2,77±0,27 ^{ххх}	+1,47
Аскорбатзависимая система перекисления	3,64±0,29	9,97±0,31 ^х	+173,90	3,79±0,29 ^{хх}	+4,12	3,72±0,29 ^{ххх}	+2,18	3,66±0,29 ^{хх}	+0,55

Примечание. n=16; обозначения те же, что и в табл. 1-3

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют прийти к принципиально новым выводам по особенностям корригирующего действия сверхнизких концентраций ТСН на интенсивность течения процессов СРО липидов и количественные колебания МДА в МЭ крови лиц

с ранними и поздними гестозами. Они свидетельствуют о терапевтической эффективности ТСН при изученной патологии и служат основанием рекомендовать его в комплексе лечебно-профилактических мероприятий при гестозах различной степени сложности.

Поступила 11.06.07

Մալոնային դիալդեհիդի քանակական փոփոխությունների առանձնահատկությունները էրիթրոցիտների քաղաքներում վաղ և ուշ արտահայտված հեստոգներով տառապող անձանց մոտ

Ա.Հ. Պետրոսյան, Մ.Կ. Ղարազյոզյան, Գ.Ա. Կևորկյան, Կ.Գ. Ղարազյոզյան, Ա.Վ. Ղազարյան

Կատարված աշխատանքների արդյունքները վկայում են այն մասին, որ էնդոմետրիումի հիպերպլազիայի վաղ և ուշ արտահայտված ձևերի ժամանակ արյան էրիթրոցիտների քաղաքներում հայտնաբերվում է լիպիդների ազատա-դիկալային օքսիդացման պրոցեսի վերջնական նյութի՝ մալոնային դիալդեհիդի քանակի արտահայտված ավելացում: Վերջինս հայտնի է իր քաղաքատրոսիկ քաղաքալիտիկ հատկություններով և որոշակի վտանգ է ներկայացնում հիվանդ օրգանիզմի համար, առավելա ուշ հեստոգները պայմաններում, երբ նշված նյութի

քանակը շատ ավելի բարձր է: Նատրիումի թիոսուլֆատի գերցածր քանակների (10^{-6} М, 10^{-9} М, 10^{-12} М) օգտագործման պայմաններում տեղի է ունենում նշված նյութի քանակի կանոնավորում, որը առավել արտահայտված է մատրիումի թիոսուլֆատի 10^{-12} М օգտագործման ժամանակ: Ստացված արդյունքները վկայում են նշված նյութի թերապևտիկ արդյունավետության մասին ուսումնասիրված ախտաբանության ժամանակ և հիմք են հանդիսանում առաջարկելու դրա կիրառումը կլինիկական պրակտիկայում:

Peculiarities of malonic dialdehyde quantitative changes in erythrocyte membranes in conditions of early and late hestoses

A.H.Petrosyan, M.K.Karageuzyan, G.A. Kevorkyan, K.G.Karageuzyan, A.V.Ghazaryan

The data obtained have shown that hyperplasia of endometrium (hestosis) is accompanied by significant abnormalities in intensity of free radical peroxidation of lipids with formation of high concentrations of malonic dialdehyde in the blood erythrocyte. It was shown that the changes mentioned are more demonstrative in case of late hestoses. Using of super low concentrations (10^{-6} M, 10^{-9} M, 10^{-12} M) of sodium thio-

sulfate in incubation media is characterized by normalization of the quantity of lipid peroxides especially under the action of 10^{-12} M of sodium thiosulfate in incubation media (37°C , pH-7.4). The results of these investigations allow to recommend using this physiological active compound in super low concentration in clinic for treatment of hestoses.

Литература

- Бдолян О.К., Едолян 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.
- Голухов Г.Н. Иммунологический статус и его коррекция у больных с пролиферативными процессами эндометрия в постменопаузе. Автореф. дис. канд. мед. наук. Второй Моск., гос. мед. институт. М., 1989.
- Жлобич М.В. Клиническое значение определения альдегиддегидрогеназы, лактата, пирувата в диагностике гиперпластических процессов и рака эндометрия. Автореф. дис. канд. мед. наук. Л., 1989.
- Запорожан В.Н., Хаит О.В., Ли Л.Н. Влияние тималина на некоторые иммунологические показатели и морфофункциональную структуру матки у морских свинок и гиперплазию эндометрия. Бюл.экспер. биологии и медицины, 1989, т. 107, 2, с. 251-253.
- Казарян А.В. Особенности структурных изменений фосфолипидов головного мозга белых крыс с сахарным диабетом, моделированным аллоксаном. Изд. Международной конференции "Ломоносов - 2005", Москва, 2005, с. 437-439.
- Казарян А.В. Особенности антиоксидантного действия сверхнизких доз тиосульфата натрия на фоне моделированного сахарного диабета у белых крыс. Изд. Международной конференции "Ломоносов - 2007", Москва, 2007, с. 322-324.
- Казарян А.В., Карагезян К.Г. Комбинированная антиоксидантотерапия сверхнизких доз факторов химической природы при нарушениях метаболизма фосфолипидов у белых крыс с моделированным аллоксаном сахарным диабетом. Конференция, посвященная 100-летию акад. Н.М.Сисакяна. Ереван, 2007 г.
- Казарян А.В., Овакимян С.С., Секоян Э.С., Карагезян К.Г. Особенности антикоагулянтных свойств вновь синтезированных препаратов кумаринового ряда. ДНАН Армении, 2006, т. 106, 1, с. 72-79.
- Карагезян К.Г., Бдолян О.К., Казарян А.В., Овакимян С.С. Специфика функциональной активности метаболизма глицерина в биологических системах белых крыс с сахарным диабетом, моделированным аллоксаном. Мед. наука Армении НАН РА, 2006, т. XLVI, 2, с. 3-7.
- Карагезян К.Г., Казарян А.В., Едолян Л.В., Овакимян С.С. Молекулярные механизмы антикоагулянтного действия соединений кумариновой природы. ДНАН Армении, 2006, т. 106, 2, с. 194-201.
- Мартirosyan A.A., Казарян А.В., Секоян Э.С., Карабашян Л.В., Джантоладян Е.Г., Амирханян О.М., Овакимян С.С., Овсепян Л.М., Данилова Л.Л. 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.
- Мелкумян А.В., Бдолян О.К., Тер-Григорян А.С., Едолян Л.В., Казарян А.В., Карагезян К.Г. Особенности нарушений фосфолипидов мозговой и печеночной тканей белых крыс при оксидативном стрессе, моделированном различными сроками голодания. Мед. наука Армении НАН РА, 2006, т. XLVI, 4, с. 9-15.
- Dawson T.M., Steiner J.P., Dawson V.L., Dinerman J.L., Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, p.9808-9612.
- Ghazaryan A.V., Hovsepyan L.M., Karageuzyan K.G. Specificities of phospholipids metabolism in rat brain tissue under the conditions of diabet mellitus, modulated by alloxan, Iranian J. Biochem. and Mol. Biol., Iran, 2005, p.31.
- Karageuzyan K.G., Zh.A. Ktsoyan, A.V. Ghazaryan et al. Lysophosphatidilcholines of blood as an possible ethiopathogenic factor at familial mediteranean fever (periodic disease), International J.on Immunorehab., Athens, 2005, 7, 2, p.102.
- Karageuzyan K.G., Ghazaryan A.V., S.S.Hovakimyan, Karagozyan M.K. et al. Peculiarities of the physiological

activity of newly synthesized preparations of coumarin nature on rat brain tissue thromboplastic activity, *International J. on Immunoreab.*, Tenerife, 2006, 7, 3, p.114.

17. Keller J.N., Kindy M.S., Holstberg F.W., St Clair D.K., Yen H.C. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction, *J. Neurosci.*, 1998, 18, p.687-697.
18. Lee M.J., Van Broycklin J.R., Thangada S., Liu C.H., Hand A.R., Menzelev R., Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1, *Science*, 1998, p. 1552-1555.
19. 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.
20. Palazzo J.P., Mercer W.E., Kovatich A.J., McHugh M. Immunohistochemical localization of p21 (WAF1/CIP1) in normal, hyperplastic, and neoplastic uterine tissue, *Hum. Pathology*, 1997, 1, 28, p.60-66.