

БИОХИМИЯ

УДК 531.3+548.4+611.8+599.323.4+616-099+547.455.522

М. К. Карагезян

Динамика нарушений процессов перекисеобразования в общем мозговом гомогенате белых крыс при зеараленовой интоксикации и корригирующее действие сверхнизких концентрации двуспиральной РНК на этом фоне

(Представлено академиком М.А.Давтяном 14/ХІІ 2012)

Ключевые слова: *гидроперекиси, малоновый диальдегид, зеараленовая интоксикация, общий мозговой гомогенат, ферментативная и неферментативная системы окисления.*

Результаты ранее проведенных исследований [1-4] свидетельствуют о развитии глубоких патобиохимических изменений качественно-количественного состава фосфолипидов (ФЛ) различных категорий в нервных образованиях беспородных белых крыс при интоксикации микотоксином зеараленоном (ЗИ). Отмечаемая при этом активация фосфолипазы А₂ сопровождается деацилированием ФЛ-глицеридов, в частности фосфатидилхолинов (ФХ), и характеризуется образованием при этом высокого пула неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) преимущественно полиенового ряда. Интенсивное вовлечение последних в реакции свободнорадикального окисления (СРО) приводит к значительному возрастанию концентрации гидроперекисей (ГП) и конечного продукта СРО – малонового диальдегида (МДА) как основных составляющих в арсенале факторов общего патогенетического механизма болезненных состояний, в данном случае при ЗИ.

Исходя из научной информации о стимулирующей роли экзогенных РНК в восстановительных процессах [5], а также участии информационной РНК в белоксинтезирующих механизмах и формировании общего организменного иммунитета [6] в настоящей статье исследовано действие при ЗИ сверхнизких концентраций содержащейся в составе РНК дс-РНК, характеризующейся исключительно высоким уровнем терапевтической эффективности [7]. При этом учитывалось укоренившееся мнение об ин-

терферонстимулирующей способности дс-РНК [8] и участии ее в обеспечении иммунных ответов Т- и Б-клеток [9, 10].

Содержание липидных перекисей определялось по интенсивности окрашивания образуемых ими комплексов [11-13] в 1 мл инкубационной смеси с учетом особенностей перекисеобразовательного процесса в ферментативной системе инкубационной смеси, состоящей из 40 мМ Трис-НСl буфера (рН 7.4), $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 12×10^{-6} М, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 2×10^{-4} М, 1 мМ NADPH, и в неферментативной системе в среде, состоящей из 40 мМ Трис-НСl буфера (рН 7.4), $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 12×10^{-6} М, и 0,8 мМ аскорбата в водяной бане при 37⁰С и постоянном встряхивании в течение 1 ч.

Содержание ГП определялось смешиванием надосадочной жидкости с 13.5 л этилового спирта, 0.1 мл концентрированной соляной кислоты и 0.02 мл 5%-ного раствора соли Мора (перекристаллизованного из 3%-ного раствора соляной кислоты) с добавлением к ней спустя 30 с после тщательного встряхивания 0.5 мл 20%-ного раствора перекристаллизованного тиоционата аммония. Образующееся при этом комплексное соединение окрашивалось в малиновый цвет. Спектрофотометрическое измерение его оптической плотности в течение 10 мин при максимуме поглощения E_{480} служило показателем количественного содержания ГП в данном исследуемом материале.

Определение уровня МДА (ТБК-активных продуктов) базировалось на его взаимодействии с 2-ТБК после смешивания надосадочной жидкости с 0.2 мл, 0.6 N соляной кислоты, 0.8 мл 0.12 М ТБК и нагревания смеси при 100⁰С в течение 10 мин. Образующийся при этом триметиновый комплекс в виде розового хромогена характеризуется максимальным поглощением при 532 нм с молярным коэффициентом экстинкции $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$. Расчет количественного содержания продуктов перекисления липидов в обеих системах производится с учетом количества предварительно определенного белка по коэффициентам: для ГП – $E_{480}/\text{мг}$ белка, а МДА – $E_{532}/\text{мг}$ белка.

Несмотря на чувствительное доминирование контрольных уровней ГП и особенно МДА в неферментативной системе окисления липидов, количественные сдвиги продуктов перекисления липидов в общем мозговом гомогенате в обоих случаях характеризуются заметным активированием этого процесса в указанные периоды развития ЗИ (табл. 1). Наиболее наглядно они представлены при испытании одного из наиболее эффективных детоксицирующих средств антиоксидантного действия – дс-РНК как соединения, специфика антирадикального действия которого обусловлена корригирующим влиянием на процесс вовлечения НЭЖК в реакции СРО и нейтрализацию уже образовавшихся при этом продуктов перекисеобразования. Исходя из приведенных данных становится очевидным, что токсические эффекты ЗИ характеризуются ярко выраженным активированием реакций перекисеобразования, особенно в ферментативной (NADPH-зависимой) и в меньшей степени неферментативной (аскорбатзависимой) системе окисления липидов.

Таблица 1

Сдвиги содержания гидроперекисей (E_{480} /мг белка) и малонового диальдегида (в нМ/мг белка) в общем мозговом гомогенате белых крыс в ферментативной и неферментативной системах окисления липидов в контроле (К), через 1 ч (1), 24 ч (2), 48 ч (3), 72 ч (4) после ЗИ

П	Ферментативная система окисления								
	К	1	% разн от К	2	% разн от К	3	% разн от К	4	% разн от К
1	0.49±0.03	0.93± 0.04 ^a	+90.0	1.07± 0.06 ^a	+118.0	1.19± 0.07 ^a	+143.0	1.27± 0.08 ^a	+159.0
2	1.99±0.06	4.37± 0.06 ^a	+120.0	4.76± 0.07 ^a	+139.0	4.93± 0.09 ^a	+148.0	5.11± 1.03 ^a	+157.0
	Неферментативная система окисления								
3	0.71±0.03	1.22± 0.04 ^a	+72.0	1.32± 0.05 ^a	+86.0	1.39± 0.07 ^a	+96.0	1.47± 0.07 ^a	+107.0
4	4.17±0.07	6.38± 0.09 ^a	+53.0	6.51± 0.17 ^a	+56.0	6.65± 0.16 ^a	+60.0	7.03± 0.19 ^a	+69.0

Примечание: n=17, a – P>0.001.

Примечательна при этом интенсивность образования ГП, наиболее отчетливо проявляющаяся спустя 72 ч после ЗИ с некоторым доминированием над динамикой формирования МДА в неферментативной системе окисления.

Согласно данным, приведенным в табл. 2, развитие отмеченных нарушений прерывается спустя уже 1 ч после однократного внутримышечного введения на фоне ЗИ 1 мл 10^{-12} М раствора дс-РНК, сменяясь последовательно развивающимся упорядочением количественного содержания исследуемых продуктов перекисления липидов в обеих системах с окончательной нормализацией через 72 ч после действия дс-РНК.

Как вытекает из данных, приведенных в табл. 3, однократное внутримышечное введение интактным животным дс-РНК в отмеченной концентрации не сопровождается по истечении 1 ч статистически достоверными отклонениями от контрольных показателей количественного содержания ГП и МДА. Аналогичная закономерность прослеживалась на протяжении 72 ч после выработки ЗИ на фоне предварительного введения указанной дозы испытанного нами физиологически активного соединения, известного в фармацевтической практике под названием препарата “Ларифан”. Примечательна при этом однотипность наблюдающейся картины в обеих системах перекисеобразования, что является отчетливым подтверждением его терапевтической эффективности, связанной с антиоксидантным действием. Последнее неоднократно констатировалось в многочисленных клинико-экспериментальных исследованиях, в частности при остром туберкулезном воспалении легких [14, 15].

Таблица 2
Сдвиги содержания гидроперекисей (E_{480} /мг белка) и малонового диальдегида (в нМ/мг белка) в общем мозговом гомогенате белых крыс в ферментативной и неферментативной системах окисления липидов в контроле (К), через 1 ч (1) после ЗИ и спустя 1 ч (2), 24 ч (3), 48 ч (4), 72 ч (5) после инъекции дс-РНК на этом фоне

II	Ферментативная система окисления										
	К	1	% разн от К	2	% разн от К	3	% разн от К	4	% разн от К	5	% Разн от К
1	0.58± 0.03	1.09± 0.05 ^a	+88.0	0.89± 0.04 ^a	+53.0	0.78± 0.03 ^b	+35.0	0.64± 0.03 ^c	+10.0	0.59± 0.03 ^c	+2.0
2	2.08± 0.07	4.75± 0.05 ^a	+128.0	3.84± 0.05 ^a	+87.0	2.96± 0.04 ^b	+42.0	2.37± 0.07 ^c	+14	2.24± 0.06 ^c	+8.0
	Неферментативная система окисления										
3	0.79±0.03	1.35± 0.06 ^a	+71.0	1.07± 0.05 ^a	+35.0	0.96± 0.04 ^b	+22.0	0.79± 0.03 ^c	0	0.77± 0.33 ^c	-3.0
4	4.29±0.09	6.54± 0.08 ^a	+52.0	5.47± 0.07 ^a	+28.0	4.96± 0.07 ^b	+16.0	4.54± 0.08 ^c	+6.0	4.45± 0.07 ^c	+4.0

Примечание: n=18, a - P>0.001; б - P<0.01; c - P>0.5.

Таблица 3
Сдвиги содержания гидроперекисей (E_{480} /мг белка) и малонового диальдегида (в нМ/мг белка) в общем мозговом гомогенате белых крыс в ферментативной и неферментативной системах окисления липидов в контроле (К), через 1 ч (1) после ЗИ и спустя 1 ч (2), 24 ч (3), 48 ч (4), 72 ч (5) после инъекции дс-РНК на этом фоне

II	Ферментативная система окисления										
	К	1	% разн от К	2	% разн от К	3	% разн от К	4	% разн от К	5	% разн от К
1	0.51± 0.03	0.54± 0.04 ^c	+6.0	0.51± 0.04 ^c	0	0.53± 0.03 ^c	+4.0	0.52± 0.03 ^c	+2.0	0.52± 0.03 ^c	+2.0
2	2.15± 0.06	2.17± 0.07 ^c	+0.9	2.16± 0.06 ^c	+0. 5	2.13± 0.06 ^c	-1.0	2.16± 0.06 ^c	+0.5	2.17± 0.06 ^c	+0.9
	Неферментативная система окисления										
3	0.73± 0.03	0.68± 0.03 ^c	-7.0	0.70± 0.03 ^c	-4.0	0.75± 0.04 ^c	+3.0	0.69± 0.04 ^c		0.72± 0.04 ^c	-1.0
4	4.05± 0.08	4.07± 0.08 ^c	+0.5	4.09± 0.07 ^c	+1. 0	4.10± 0.07 ^c	+1.0	4.09± 0.07 ^c		4.09± 0.07 ^c	+1.0

Примечание: n=20, c - P>0.5.

Таким образом, становится очевидной конкретная направленность нормализующего действия дс-РНК при токсикозах различных этиологий и в данном случае при ЗИ.

Государственный инженерный университет Армении

М. К. Карагезян

Динамика нарушений процессов перекисеобразования в общем мозговом гомогенате белых крыс при зеараленовой интоксикации и корригирующее действие сверхнизких концентрации двуспиральной РНК на этом фоне

Установлено значительное активирование процесса перекисеобразования в общем мозговом гомогенате белых крыс при моделированной зеараленовой интоксикации, который характеризуется чувствительным увеличением в мозговой ткани количественного содержания гидроперекисей и малонового диальдегида, особенно спустя 72 ч после развития указанного болезненного состояния организма. Применение на этом фоне сверхнизких концентраций (10^{-12} М) рибонуклеиновой кислоты нормализует указанные расстройства и восстанавливает контрольные уровни этих перекисей, что свидетельствует о мощной антиоксидантной активности примененного физиологически активного соединения.

Մ. Կ. Ղարագյոզյան

Գերօքսիդառաջացման գործընթացների խանգարումները սպիտակ առնետների ուղեղային ընդհանուր խառնվածքում զեարալենոնային թունավորումների ժամանակ և երկպարուրային ՌՆԹ-ի գերցածր քանակների վերականգնիչ հատկությունը նշված պայմաններում

Բացահայտվել է զեարալենոնային թունավորման ժամանակ սպիտակ առնետների ուղեղային հյուսվածքում տեղի ունեցող գերօքսիդառաջացման գործընթացների ակտիվացումը: Վերջինս պայմանավորված է հիդրոպերօքսիդների և մալոնային դիալդեհիդի քանակության զգալի աճով ուղեղային հյուսվածքում առավել ևս 72 ժ. անց նշված ախտաբանական վիճակի զարգացումից: Ռիբոնուկլեինաթթվի գերցածր քանակների (10^{-12} Մ) օգտագործումը նշված պայմաններում զուգորդվում է զեարալենոնային թունավորման երևույթների հետ աճով և նշված գերօքսիդների ստուգիչ քանակական մակարդակների վերականգնմամբ: Վերջինս վկայում է մեր կողմից կիրառված ֆիզիոլոգիապես ակտիվ միացության բացառիկ հակաօքսիդանտային ակտիվության մասին:

M. K. Karageuzyan

Disorders of Peroxide Formation Processes Dynamics in Whole Brain Homogenate of White Rats under the Zearalenon Intoxication and Normalizing Action of Superlow Concentrations of Double-Stranded RNA on this Background

Our data obtained have shown that zearalenon intoxication of rats is accompanied by significant activation in brain homogenate of peroxideformation process which is conditioning by

quantitative increase of hydroperoxides and malonyldialdehyde in brain tissue especially in 72 hours after zearalenon intoxication development. Use of the superlow concentrations (10^{-12} M) of double-stranded RNA on this background normalizes the disorders and restores control levels of the mentioned peroxides. The results obtained demonstrate the high antioxidant activity of the physiologically active compound used in our investigations.

Литература

1. *Карагезян М.К., Овакимян С.С., Овсепян Л.М., Бояджян А.С., Осипян Л.Л., Карагезян К.Г.* - Докл. РАН. 1995. Т. 341. N 3. С. 408-411.
2. *Карагезян М.К., Овсепян Л.М., Овакимян С.С., Бояджян А.С., Осипян Л.Л., Карагезян К.Г.* - Докл. РАН. 1995. Т. 341. N 2. С. 259-262.
3. *Карагезян М.К.* Изучение молекулярных механизмов токсических эффектов микотоксина зearаленона. Автореф. канд. дис. Ереван. 1997. 26 с.
4. *Карагезян М.К.* - Укр. биохим. журн. 2000. Т. 72. N 3. С.105-109.
5. *Белоус А.М., Годин В.П., Панков Е.А.* В кн.: Экзогенные нуклеиновые кислоты и восстановительные процессы. М. 1974. С. 3-44.
6. *Земсков А.М., Провоторов В.М., Никитин А.В.* – Антибиотики. 1979. N 11. С. 853-855.
7. *Агабян А.С., Казанчян А.Ф., Сафарян А.С. и др.* - ДАН АрмССР. 1983. N 5. С. 228-231.
8. *Захарян Р.А., Месропян Н.П., Мовсесян А.В., Агабян А.С., Акопян Ж.И.* - Экспериментальная онкология. 1985. N 3. С. 54-56
9. *Соловьев В.Д.* Интерфероны в теории и практике медицины. М. Медицина. 1981. С. 321-341.
10. *Бурлакова Е.Б.* - Рос. хим. ж. (Журн. Рос. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева). 1999. Т. 43. N 5. С. 55-63
11. *Lowry D.H., Rosenroug N.Y., Farr A.L., Randall R.J.* - J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-269.
12. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М. Наука. 1972. 252 с.
13. *Билин Л.Ф.* Роль антиоксидантов в упорядочении нарушенных сторон метаболизма фосфолипидов в мембранах эритроцитов больных острым лейкозом. Канд. дис. Л. 1986. 162 с.
14. *Карагезян К.Г., Сафарян М.Д., Мелкумян А.В., Карагезян М.К.* – Докл. РАН. 1996. Т. 349. N 1. С.115-117.
15. *Карагезян К.Г., Сафарян М.Д., Мелкумян А.Б., Карагезян М.К.* - ДНАН РА. 2004. Т. 104. N 3. С. 217-222.