12. Petrovic V., Buzadzic B., Korac A., et al. Anti-oxidativedefence alterations in skeletal muscle during prolonged acclimation to cold: role of L-arginine/NO-producing pathway // The Journal of Experimental Biology. – 2008. – Vol. 211, № 1. – P. 114-120.

13. Song Y., Ho E. Zinc and prostatic cancer // Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. – 2009. – Vol. 12, № 6. – P. 640-645.

14. Vasilijevic A., Buzadzic B., Korac A., et al. The effects of cold acclimation and nitric oxide on antioxidative enzymes in rat pancreas // Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology & Pharmacology. – 2007. – Vol. 145, № 4. – P. 641-647.

15. Yan M., Song Y., Wong C.P., et al. Zinc deficiency alters DNA damage response genes in normal human prostate epithelial cells // The Journal of Nutrition. – 2008. – Vol. 138, № 4. – P. 667-673.

Координаты для связи с авторами: *Саяпина Ирина Юрьевна* – д-р биол. наук, доцент кафедры гистологии и биологии АГМА, тел.: 8-(4162)-31-90-14, +7-924-580-77-40, e-mail: sayapina_agma@mail.ru; *Целуйко Сергей Семёнович* – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии и биологии АГМА, тел. 8-(4162)-31-90-14, e-mail: agma.agma@yandex.ru; *Чередниченко Оксана Александровна* – студентка 5-го курса АГМА, e-mail: Cherednichenko-45@mail.ru.

УДК 543.872:577.125:612.35:615.27

В.И. Тиханов

СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЕРЕКИСНОГО (СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО) ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ГЕКСАМЕТОНИЯ И 3-ЧАСОВОГО ОХЛАЖДЕНИЯ ЖИВОТНЫХ С РЕЗУЛЬТАТАМИ ИНДУЦИРОВАННОГО ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ В ПРИСУТСТВИИ ГЕКСАМЕТОНИЯ IN VITRO

Амурская государственная медицинская академия,
675000, ул. Горького, 95, тел. 8-(4162)-31-90-09, e-mail: amurgma@list.ru, г. Благовещенск

Резюме

Метод возбуждения периферических мускарино-чувствительных холинореактивных структур метабототропных G-белков плазматических мембран эндогенным ацетилхолином предусматривает предварительное введение экспериментальным животным периферического, неселективного никотино-чувствительного холинолитика.

Перед применением метода определялось влияние периферического, неселективного никотино-чувствительного холинолитика гексаметоний на содержание диеновых коньюгатов (ДК), гидроперекисей (ГП) общих липидов (ОЛ) печени и малонового диальдегида (МДА) гомогената печени после 3-часового охлаждения животных.

Сопоставлялись результаты окисления липидов печени полученных in vivo при введении животным гексаметония с результатами окисления липидов микросом печени полученных in vitro в присутствии гексаметония. Индуцирование ПОЛ in vitro осуществлялось ферментативными (NADP • H-зависимыми) механизмами.

На основе сопоставления результатов окисления липидов произведенных in vivo, in vitro было высказано предположение о влиянии на перекисное (свободнорадикальное) окисление липидов печени блокады периферических никотино-чувствительных холинореактивных структур лиганд проводящих ионных каналов плазматической мембраны гепатоцитов гексаметонием.

Ключевые слова: **гексаметоний, диеновые коньюгаты, гидроперекиси, малоновый диальдегид, эндогенный ацетилхолин, ферментативное (NADP • H-зависимое) окисление липидов.**

V.I. Tikchanov

COMPARISON OF THE RESULTS OF PER OXIDATION (FREE RADICAL) OF LIVER LIPIDS AT THE BACKGROUND OF HEXAMETHONIUM INJECTION AND 3-HOUR EXPOSURE TO COLD OF ANIMALS WITH THE RESULTS OF THE INDUCE PEROXIDATION OF LIPIDS OF LIVER MICROSOMES WITH HEXAMETHONIUM IN VITRO

Amur state medical academy, Blagoveshchensk

Summary

Method of the stimulation of peripheral muscarine sensitive cholinoreactive structures of metabototrophine G-proteins with endogenous acetylcholine presumes a preliminary injection of peripheral, non-selective nicotine – sensitive cholinolytic to experimental animals.

Before the application of the method the influence of peripheral, non-selective nicotine – sensitive cholinolytic hexamethonium on the content of the diene conjugates (DC), hydroperoxides (HP) of common lipids (AL) of the liver and liver malondialdehyde (MDA) of liver homogenate after the 3-hour exposure to cold in animals was determined.

The results of hepatic lipid oxidation obtained in vivo at hexamethonium injection to animals were compared to the results of oxidation of lipids of liver microsomes made in vitro with hexamethonium. The induction of lipid peroxidation in vitro was carried out with enzymatic (NADP • H-dependent) mechanisms.

Comparing the results of lipid oxidation in vivo and in vitro the hypothesis on the influence of block of peripheral, non-selective nicotine – sensitive cholinolytic structures ligand of conductive ion canals of plasmatic membrane of hepatocytes with hexamethonium on the lipids peroxidation (free radical) could be made.

Key words: **hexamethonium, diene conjugates, hydroperoxide, malondialdehyde, endogenous acetylcholine, enzymatic (NADP • H-dependent) lipid oxidation.**

Метод возбуждения периферических мускариночувствительных ацетилхолиновых зон (рецепторов) метабототропных G-белков [17] эндогенным ацетилхолином (АЦХ) позволяет решать многие задачи не только в клинике [5], но и в экспериментальной медицине.

Накопление эндогенного АЦХ в ткани печени приводит к изменению содержания продуктов, субстратных составляющих перекисного (свободнорадикального) окисления липидов (ПОЛ) печени [12], и ставит перед нами очередную задачу – оценить влияние возбуждения периферических мускарино-чувствительных рецепторов метабототропных G-белков эндогенным АЦХ на выраженность продуктов ПОЛ печени животных после 3-часовой холодовой нагрузки.

Применение метода возбуждения периферических мускарино-чувствительных рецепторов метабототропных G-белков плазматических мембран клеток эндогенным АЦХ обосновывает перед применением фармакологического агента накапливающего антихолинэстеразными механизмами АЦХ в тканях предварительное введение животным неселективного, периферического никотино-чувствительного холинолитика.

Цель данной работы – выявление возникающих при введении неселективного, периферического никотино-чувствительного холинолитика гексаметоний изменений продуктов ПОЛ печени in vivo, оценка способности к окислению липидов микросом печени в присутствии гексаметония in vitro , сопоставление и анализ полученного in vivo и in vitro экспериментального материала.

Материалы и методы

Исследования проводились на белых, беспородных крысах-самцах массой до 170-200 гр. Выбор экспериментальных животных основывался на задачах экспериментов, связанных с феноменом стресс [1]. Кратковременное охлаждение животных проводилось в климатокамере с температурным режимом – 12 °С, на протяжении 3 часов [4].

Содержание диеновых коньюгатов (ДК), гидроперекисей (ГП) определяли во фракции общих липидов (ОЛ). ОЛ экстрагировали из гомогената печени методами Фолча [3], Блайя – Дайлера [13, 14]. В основе метода определения ДК и ГП лежали методы, описанные Стальной И.Д. и Романовой Л.А. [8, 11]. Малоновый диальдегид (МДА) определяли в водной фазе гомогената печени по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой и образования триметинового комплекса при спектре поглощения 532 нм [10].

Липиды микросом печени с содержанием гексаметония в инкубационной среде окислялись ферментативными (NADP • H-зависимыми) механизмами in vitro и сравнивались с пробами, где окислялись только липиды микросом печени.

Молярная концентрация гексаметония в инкубационной среде создавалась согласно дозам гексаметония, работающего in vivo.

Гексаметоний был выбран с учётом того, что данный фармакологический агент по-прежнему широко используется в клинической практике [16], блокируя работу периферических никотино-чувствительных реактивных структур лиганд проводящих ионных каналов плазматической мембраны [15].

Статистическая обработка результатов произведена с применением непараметрического дисперсионного анализа W.H. Kruskal, W.A. Wallis, парного критерия Манна – Уитни (Mann – Whitney,U – test), количественные значения представлены в виде медианы (Me), 5-го и 95-го процентилей [2, 7].

Результаты и обсуждение

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что 3-часовая холодовая нагрузка увеличивает содержание ДК ОЛ, уменьшает выраженность ГП ОЛ печени (табл. 1). Введение экспериментальным животным гексаметония (0,2 мг/кг, 2 мг/кг, 20 мг/кг) на фоне 3-часовой холодовой нагрузки вызывает более выраженное снижение содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени при сравнении с данными группы контроль$_2$ (табл. 1).

Холодовая нагрузка в течение 3 часов не увеличивает содержание МДА гомогената печени (табл. 1). Введение животным гексаметония на фоне холода приводит к большему снижению МДА. Так, в группах животных опыт$_1$ снижение МДА отмечалось в 1,2 раза, в группе животных опыт$_2$ – в 1,13 раза больше при сравнении с животными группы контроль$_2$ соответственно (табл. 1). В группе же животных опыт$_3$ содержание ТБК-активного продукта отмечалось на уровне контроль$_2$ (холод) (табл. 1).

Химические элементы входящие в структуру гексаметония, способны вызывать как одноэлектронное окисление, так и одноэлектронное восстановление липидов [6].

В связи с этим, проводились эксперименты in vitro с присутствием в инкубационной среде гексаметония мольной концентрации, соответствующей вводимой животным дозе периферического, неселективного никотино-чувствительного холинолитика.

Результаты экспериментов свидетельствуют: гексаметоний вызывает увеличение окисления липидов

печени во всех предложенных мольных концентрациях при индуцировании ферментативных (NADP • Н-зависимых) механизмов окисления липидов печени (табл. 2).

Таблица 1

Содержание диеновых коньюгатов, гидроперекисей общих липидов печени, малонового диальдегида гомогената печени после 3-часового охлаждения экспериментальных животных и введения гексаметония

Показатели	Диеновые коньюгаты (нмоль/мг липида)	Гидроперекиси (нмоль/мг липида)	Малоновый диальдегид (нмоль/мл гомогената)
1 группа, контроль$_1$ (интактные), n=6	143,4 [133,9÷158,4]	11,0 [9,46÷15,7]	1,966 [1,848÷2,108]
2 группа, контроль$_2$ (холод), n=6	187,0 [179,0÷203,3] P_{2-1}=0,00394	8,32 [7,04 ÷ 9,25] P_{2-1}=0,0039	1,745 [1,586÷1,8] P_{2-1}=0,00394
3 группа, опыт$_1$ (холод+гексаметоний 0,2 мг/кг), n=6	118,4 [110,1÷138,6] P_{3-2}=0,00422	5,04 [3,68÷6,02] P_{3-2}=0,000131	1,417 [1,29÷1,5] P_{3-2}=0,0115
4 группа, опыт $_2$ (холод+гексаметоний 2 мг/кг), n=6	141,2 [126,6÷161,1] P_{4-2}=0,004 P_{4-3}=0,037	6,01 [5,62÷7,01] P_{4-2}=0,0423 P_{4-3}=0,0163	1,5 [1,4 ÷1,56] P_{4-2}=0,00394 P_{4-3}=0,0781
5 группа, опыт $_3$ (холод+гексаметоний 20 мг/кг), n=6	113,7 [95,6 ÷132,4] P_{5-2}=0,001 P_{5-3}=0,484* P_{5-4}=0,0104	6,63 [5,8÷7,1] P_{5-2}=0,004 P_{5-3}=0,00513 P_{5-4}=0,149*	1,775 [1,613÷1,821] P_{5-2}=0,862* P_{5-3}=0,003 P_{5-4}=0,01

Примечание. Здесь и далее в таблицах при значке * значения р недостоверны.

Сопоставляя результаты экспериментов полученные in vivo и in vitro следует обратить внимание на следующее – периферический неселективный никотино-чувствительный холинолитик гексаметоний, вводимый экспериментальным животным, снижает выраженность продуктов ПОЛ печени (табл. 1), а его присутствие в инкубационной среде при индуцировании ПОЛ in vitro ферментативными (NADF • Н-зависимыми) механизмами, способствует усилению окисления липидов печени (табл. 2).

Таблица 2

Окислительная активность гексаметония в инкубационной среде при индуцировании ферментативного (NADP • Н-зависимого) механизма окисления липидов микросом печени

Показатели	Мольная концентрация гексаметония в инкубационной среде		
	10^{-4} М	10^{-5} М	10^{-6} М
Окислительная активность гексаметония	-4,62 % [0,7; 10,7]	-8,7 % [4,4; 16,5]	-12,2 % [4,9; 22,4]

Примечание. (-) – усиление окисления липидов.

Уменьшение содержания продуктов ПОЛ при введении гексаметония экспериментальным животным на фоне 3-часовой холодовой нагрузки невозможно обьяснить только химическими элементами, входящими в структуру гексаметония. Предполагаем, снижение продуктов окисления липидов печени in vivo вызывается блокадой периферических никотино-чувствительных холинореактивных структур лиганд проводящих ионных каналов плазматической мембраны гепатоцитов, вызываемой введением периферического неселективного никотино-чувствительного холинолитика гексаметоний.

Выводы

1. Периферический неселективный никотино-чувствительного холинолитик гексаметоний при введении животным снижает выраженность диеновой коньюгации, гидроперекисей общих липидов печени и малонового диальдегида ткани печени в период 3-часовой холодовой нагрузки.

2. Индуцирование ферментативных (NADP • Н-зависимых) механизмов перекисного (свободнорадикального) окисления липидов in vitro в присутствии гексаметония мольной концентраций 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М увеличивает перекисное (свободнорадикальное) окисление липидов микросом печени.

3. Сопоставление результатов экспериментов in vivo и in vitro в присутствии гексаметония даёт основание считать, что изменение содержания продуктов ПОЛ печени не обьясняется химическими элементами, входящими в структуру периферического, неселективного никотино-чувствительного холинолитика гексаметоний.

Литература

1. Белорыбкина Л. И., Дмитриченко Л.М., Карчевская С.А., Куртасова Т.П. Анализ роли вегетативных нервных механизмов и коры надпочечников в реакциях животных на охлаждение и перегревание: сборник // Физиология и фармакология терморегуляции. – Минск, 1978. – С. 32-41.

2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459с.

3. Кейтс М. Техника липидологии. – М.: Мир, 1975. – 321 с.

4. Круглова О.Г. Влияние дигидрокверцетина на перекисное окисление липидов в условиях холодового воздействия: дисс. … канд. мед. наук. – Благовещенск, 2014. – 235 с.

5. Лосев Н.А. Фармакология – клинике (с учётом взаимодействия М- и Н-холинергических механизмов): актовая речь на заседании Учёного совета Института Экспериментальной Медицины. – СПб., 2007. – 44 с.

6. Моргунова Т.В., Лазарева Д.Н. Влияние лекарственных средств на свободно – радикальное окисление // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2000. – Т. 63, № 1. – С. 71-75.

7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Медиа-Сфера, 2002. – 312 с.

8. Романова Л.А., Стальная И.Д. Метод определения гидроперекисей липидов с в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина,1977. – С. 64-66.

9. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. – М.: Наука, 1960. – 254 с.

10. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты : сборник. современные методы в биохимии / под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.

11. Стальная И.Д. Метод определения диеновой коньюгации ненасыщенных высших жирных кислот:

сборник. современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 64-66.

12. Тиханов В.И., Лосев Н.А., Доровских В.А. и др. Изменение продуктов и субстратных составляющих перекисного окисления липидов в ткани печени на фоне холодовой нагрузки и введении непрямых мускарино-чуствительных и никотино-чуствительных холиномиметиков // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2013. – № 50. – P. 61-67.

13. Bligh E.C., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Biochem. Physiol. – 1959. – Vol. 37. – P. 911-917.

14. Furusava N., Nakamura M., Morita Y., et al. Simple and rapid extraction method of total egg lipids for determining organochlorine pesticides in the egg // Journal of Chromatography A. – 1999. – Vol. 830. – P. 473-476.

15. Hurst R., Rollema H., Bertrand, D. Nicotinic acethylcholine receptors from basic science to therapeutics // Pharmacol. Ther. – 2013. – Vol. 137. – P. 22-54.

16. Lu W.H., Hsieh K.S., Lu P.J., et al. Hexamethonium reverses the lethal cardiopulmonary damages in a rat model of brainstem lesions mimicking fatal enterovirus 71 encephalitis // Critical Care Medicine. – 2013. – Vol. 41, № 5. – P. 1276-1285.

17. Xie X.Q., Wang L., Lin H., et al. Chemogenomics knowed debased polypharmacology analyses of drug, abuse related G-protein coupled receptors and their ligands // Front. Pharmacol. – 2014. – Vol. 5. – 3 p.

Literature

1. Beloribkina L.I., Dmitrichenko L.V., Karchevskaya S.A., Kurtasova T.P. Analysis of vegetal neuromechanisms and suprarenal cortex role in the reaction of animals on exposure to cold and heat: collection of research papers // Physiology and pharmacology of thermoregulation. – Minsk, 1978. – P. 32-41.

2. Glants S. Medico-biological statistics. – M.: Praktika, 1998. – P. 459.

3. Keits M. Techniques of lipidology. – M.: Mir, 1975. – P. 321.

4. Kruglova O.G. Influence of dihydroquercetin on lipid peroxidation in conditions of exposure to cold: author's thesis of Candidate of Medical Science. – Blagoveshchensk, 2014. – P. 235.

5. Losev N.A. Pharmacology – clinics (considering interactions of M- and N-cholinergic mechanisms): commencement address in a panel session of academic board of Institute of experimental medicine. – SPb., 2007. – P. 44.

6. Morgunova T.V., Lazareva D.N. Influence of drugs on lipid peroxidation // Experimental and clinical pharmacology. – Vol. 63, № 1. – P. 71-75.

7. Rebrova O.Yu. Statistical analysis of medical data. – M.: Media-Sfera, 2002. – P. 312.

8. Romanova L.A., Stalnaya I.D. Method of lipid hydroperoxides detection in biochemistry / edited by V.N. Orekhovich. – M.: Medicine, 1977. – P. 64-66.

9. Selye G. The Story of the adaptation syndrome. – M.: Science, 1960. – P. 250.

10. Stalnaya I.D. Garishvili T.G. Method of detection of malondialdehyde with thiobarbituric acid: collection of research papers. – Modern methods in biochemistry / edited by Orekhovich. – M.: Medicine, 1977. – P. 66-68.

11. Stalnaya I.D. Method of detection of diene conjugation of unsaturated higher fatty acids: collection of research papers. – Modern methods in biochemistry / edited by Orekhovich. – M.: Medicine, 1977. – P. 64-66.

12. Tikhanov V.I., Losev N.A., Dorovskikh V.A., et al. Changes in the products and substrates of lipid peroxidation in liver tissue associated with cold stress and administration of indirect M- and N-cholinomimetics // Bulletin of physiology and pathology of respiration. – 2013. – Vol. 50. – P. 61-67.

13. Bligh E.C., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Biochem. Physiol. – 1959. – Vol. 37. – P. 911-917.

14. Furusava N., Nakamura M., Morita Y., et al. Simple and rapid extraction method of total egg lipids for determining organochlorine pesticides in the egg // Journal of Chromatography A. – 1999. – Vol. 830. – P. 473-476.

15. Hurst R., Rollema H., Bertrand D. Nicotinic acethylcholine receptors from basic science to therapeutics // Pharmacol. Ther. – 2013. – Vol. 137. – P. 22-54.

16. Lu W.H., Hsieh K.S., Lu P.J., et al. Hexamethonium reverses the lethal cardiopulmonary damages in a rat model of brainstem lesions mimicking fatal enterovirus 71 encephalitis // Critical Care Medicine. – 2013. – Vol. 41, № 5. – P. 1276-1285.

17. Xie X.Q., Wang L., Lin H., et al. Chemogenomics knowed debased polypharmacology analyses of drug, abuse related G-protein coupled receptors and their ligands // Front. Pharmacol. – 2014. – Vol. 5. – 3 p.

Координаты для связи с авторами: *Тиханов Виктор Иванович* – канд. мед. наук, доцент кафедры фармакологии АГМА, тел. +7-914-589-99-13, e-mail: tikchanov@yandex.ru.