

В.И. Тиханов

РЕЦИПРОКНОСТЬ В СОДЕРЖАНИИ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО (СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО) ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ ПОЛУЧЕННЫХ IN VIVO В ПЕРИОД 3-ЧАСОВОГО ОХЛАЖДЕНИЯ ЖИВОТНЫХ. СОПОСТАВЛЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ С ОКИСЛЕНИЕМ ЛИПИДОВ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ В ПРИСУТСТВИИ МЕТАЦИНА IN VITRO

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

Резюме

Проведены исследования по оценке содержания продуктов ПОЛ в ткани печени при введении неостигмина на фоне гексаметония. Блокада периферических мускарино-чувствительных ацетилхолиновых рецепторов (mAChRs) печени достигалась отдельным введением метацина.

На основе оценки результатов введения фармакологических агентов по содержанию продуктов ПОЛ печени сделан вывод о присутствии феномена реципрокность.

Определялась способность липидов микросом печени к окислению in vitro при индуцировании ферментативных (NADP • H-зависимых) и неферментативных (аскорбатзависимых) механизмов окисления в присутствии метацина.

На основании сопоставления данных по окислению липидов микросом в присутствии метацина in vitro, с данными по содержанию продуктов ПОЛ в ткани печени при возбуждении и блокаде периферических mAChRs G-белков плазматической мембраны гепатоцитов in vivo высказывалось предположение о влиянии холинорецепторного аппарата плазматической мембраны гепатоцитов на ПОЛ печени.

Ключевые слова: неостигмин, гексаметоний, метацин, реципрокность, ферментативное (NADP • H-зависимое) окисление липидов, неферментативное (аскорбатзависимое) окисление липидов.

V.I. Tikchanov

RECIPROCITY IN THE CONTENT OF PEROXIDATION PRODUCTS (FREE RADICAL) OF LIVER LIPID OBTAINED IN VIVO DURING A 3-HOUR ANIMALS' EXPOSURE TO COLD. COMPARISON WITH THE LIPID OXIDATION OF LIVER MICROSOMES IN PRESENCE OF METATCINE IN VITRO

Amur state medical academy, Blagoveshchensk

Summary

The investigations on evaluation of content of lipid peroxidation products in liver tissue at neostigmine injection at the background of hexamethonium were performed. Blockade of peripheral muscarine – sensitive acetylcholine receptors (mAChRs) of liver was achieved by separate injection of metacine. The conclusion about the presence of reciprocity phenomenon was made based on the content of the liver lipid peroxidation products after the evaluation of the results of pharmacological agents' injection.

The ability of lipids of liver microsomes to oxidation in vitro at inducing enzymatic (NADP • H-dependent) and non-enzymatic (ascorbate – dependent) oxidation mechanisms in presence of metacine was determined.

Based on the comparison of the data on oxidation of microsome lipids in presence of metacine in vitro with the data on the content of lipid peroxidation products in liver tissue when stimulation and blockade of peripheral mAChRs G- proteins of plasma membrane of hepatocytes was achieved, made it possible to suggest that there is influence of cholinceptive apparatus of the plasma membrane of hepatocytes on peroxidation of liver lipids.

Key words: neostigmine, hexamethonium, metacine, reciprocity, enzymatic (NADP • H-dependent) lipid oxidation, non-enzymatic (ascorbate-depended) lipid oxidation.

Сопоставление результатов экспериментов, связанных с индуцированием ПОЛ печени in vivo и in vitro фармакологическими агентами, влияющими на периферическое холинергическое звено, не отвечает на вопрос: изменение содержания продуктов ПОЛ вызвано химическими элементами, входящими в структуру фармакологических агентов неостигмин и гексаметоний, или обусловлено работой эндогенного ацетил-

холина (АЦХ) с mAChRs плазматической мембраны гепатоцитов [7].

Для получения ответа использовался приём экспериментальной фармакологии, связанный с феноменом реципрокность [3].

Цель исследования – оценить присутствие реципрокности при определении содержания продуктов ПОЛ ткани печени и введении животным неостигмина

на фоне гексаметония, отдельного введения метацина в период 3-часового охлаждения животных.

Сопоставить полученные результаты со способностью липидов микросом печени окисляться *in vitro* в присутствии метацина.

Материалы и методы

Исследования проводились на белых, беспородных крысах-самцах массой от 160 до 200 гр. Выбор животных, деление на группы, условия содержания и охлаждения описывались в более ранних публикациях [5, 6].

Выбор фармакологического агента, накапливающего антихолинэстеразными механизмами эндогенный ацетилхолин (АЦХ) [1, 2] и вызывающего фармакологические эффекты в поперечнополосатой, гладкой мускулатуре, слюнных железах животных, как и выбор блокатора периферических никотино-чувствительных лиганд проводящих ионных каналов плазматической мембраны гепатоцита и вводимого животным перед применением антихолинэстеразных веществ, описывался также в предыдущих работах [6].

Выяснение реципрокности связано с последующим исключением в эксперименте периферических mAChRs, достигавшееся введением метацина [3].

Мольное содержание метацина 10^{-5} М и 10^{-6} М *in vitro* соответствует дозам метацина – 0,1 мг/кг и 1 мг/кг *in vivo*.

Определение всех ключевых продуктов ПОЛ *in vivo* и технология окисления фармакологических агентов с липидами микросом печени *in vitro* описаны в более ранних публикациях [6, 7, 8].

Статистическая обработка материала произведена методом 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 и 95-процентилей [4].

Результаты и обсуждение

Данные *in vitro* свидетельствуют: присутствие периферического неселективного М-холиноблокатора метацин в инкубационной среде увеличивает окисление липидов микросом печени при индуцировании как ферментативных (NADP • Н-зависимыми), так и неферментативных (аскорбатзависимых) механизмов окисления (табл. 1). Тепловая инактивация белка мембран эндоплазматического ретикулаума гепатоцитов приводит к противоположному результату – к уменьшению окислительного эффекта, вызываемого метацином при индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ печени (табл. 1).

Данные, полученные *in vivo*, свидетельствуют: введение неостигмина на фоне гексаметония увеличивает выраженность диеновых конъюгатов (ДК), а введение метацина уменьшает их содержание в общих липидах (ОЛ) печени (табл. 2) (напоминаем, присутствие метацина в инкубационной среде при индуцировании как ферментативных, так и неферментативных механизмов ПОЛ увеличивает окисление липидов микросом печени).

Проявление реципрокности отмечаем и при определении содержания гидроперекисей (ГП) общих липидов (ОЛ) печени, малонового диальдегида (МДА)

ткани печени: неостигмин на фоне гексаметония снижает ГП ОЛ, а метацин их увеличивает (табл. 2); неостигмин на фоне гексаметония увеличивает выраженность МДА, а в дозе 0,1 мг/кг метацин снижает его содержание (табл. 2).

Таблица 1

Окислительная активность метацина *in vitro* при индуцировании ферментативного (NADP • Н-зависимого) и неферментативного (аскорбатзависимого) механизмов окисления липидов микросом печени

Ферментативное (NADP • Н-зависимое) окисление липидов микросом печени				
показатели	микросомы печени не подвергавшиеся тепловой обработке		микросомы печени подвергавшиеся тепловой обработке	
Мольная концентрация метацина	10^{-4} М	10^{-5} М	10^{-4} М	10^{-5} М
Окислительная активность метацина	-128,3 % [103,7; 181,7]	-64,6 % [36,1; 93,7]	+116,4 % [94,5; 122,0]	+40,8 % [29,9; 6,7]
Неферментативное (аскорбатзависимое) окисление липидов микросом печени				
Мольная концентрация метацина	10^{-4} М		10^{-5} М	
Окислительная активность метацина	-31,5 % [10,5; 68,8]		-14,4 % [7,5; 21,0]	

Примечание. (-) – прооксидантный эффект, (+) – антиоксидантный эффект.

Таблица 2

Содержание диеновых конъюгатов, гидроперекисей общих липидов печени, малонового диальдегида гомогената печени после кратковременного охлаждения экспериментальных животных, введения неостигмина на фоне гексаметония и отдельного введения метацина

Показатели	Диеновые конъюгаты (нмоль/мг липида)	Гидроперекиси (нмоль/мг липида)	Малоновый диальдегид (нмоль/мг гомогената)
1 группа, контроль ₁ (интактные), n=6	112,8 [100,1; 135,2]	9,6 [8,8; 11,3]	1,9 [1,7; 2,2]
2 группа, контроль ₂ (холод), n=6	181,7 [176,2; 192,8] P ₂₋₁ =0,009	8,4 [8,0; 8,9] P ₂₋₁ =0,00902	1,2 [1,0; 1,5] P ₂₋₁ =0,0003
3 группа, опыт ₁ (холод+гексаметоний 0,2 мг/кг+неостигмин 0,2 мг/кг), n=6	208,2 [199,1; 228,1] P ₃₋₂ =0,01	8,09 [7,8; 8,4] P ₃₋₂ =0,009	1,7 [1,5; 1,9] P ₃₋₂ =0,01
4 группа, опыт ₂ (холод+гексаметоний 2 мг/кг+неостигмин 0,2 мг/кг), n=6	228,2 [200,6; 240,2] P ₄₋₂ =0,005 P ₄₋₃ =0,174*	7,07 [6,8; 7,6] P ₄₋₂ =0,009 P ₄₋₃ =0,01	1,4 [1,2; 1,6] P ₄₋₂ =0,00394 P ₄₋₃ =0,004
5 группа, опыт ₃ (холод+метацин 0,1 мг/кг), n=6	137,8 [120,2; 151,6] P ₅₋₂ =0,00438 P ₅₋₃ =0,009 P ₅₋₄ =0,01	9,4 [8,8; 10,6] P ₅₋₂ =0,00793 P ₅₋₃ =0,00902 P ₅₋₄ =0,01	1,0 [0,7; 1,0] P ₅₋₂ =0,006 P ₅₋₃ =0,0004 P ₅₋₄ =0,0002
6 группа, опыт ₄ (холод+метацин 1 мг/кг), n=6	168,3 [150,2; 182,2] P ₆₋₂ =0,117* P ₆₋₃ =0,011 P ₆₋₄ =0,009 P ₆₋₅ =0,00793	9,1 [8,7; 9,6] P ₆₋₂ =0,00902 P ₆₋₃ =0,001 P ₆₋₄ =0,00036 P ₆₋₅ =0,117*	1,25 [0,9; 1,4] P ₆₋₂ =0,361* P ₆₋₃ =0,0242 P ₆₋₄ =0,0448 P ₆₋₅ =0,0042

Примечание. * – значения р недостоверны.

Эффекты, полученные *in vivo*, свидетельствуют о присутствии реципрокности – неостигмин на фоне гексаметония увеличивает выраженность ДК, а введение метацина уменьшает их содержание в ОЛ печени; неостигмин на фоне гексаметония снижает ГП ОЛ, а

метацин их увеличивает; неостигмин на фоне гексаметония увеличивает выраженность МДА, а метацин в дозе 0,1 мг/кг снижает содержание МДА.

Необходимо отметить, что *in vitro* метацин в микросомах печени не подвергавшихся нагреванию демонстрирует усиление окисления липидов микросом печени, а липиды микросом подвергавшиеся тепловой обработке и в присутствии метацина показывают противоположный эффект – ослабление окисления липидов, что свидетельствует о участии белкового компонента мембран эндоплазматического ретикула гепатоцитов в ПОЛ печени.

Проявление реципрокности и сопоставление с окислением липидов микросом печени в присутствии метацина позволяет высказать мнение о возможном участии мускарино-чувствительного холинорецепторного компонента плазматической мембраны гепатоцитов в изменении содержания продуктов ПОЛ печени в период 3-часовой голодовой нагрузки лабораторных животных.

Выводы

1. Присутствие метацина в инкубационной среде при индуцировании ферментативных (NADP • Н-зави-

симых) и неферментативных (аскорбатзависимых) механизмов усиливает окисление липидов микросом печени, тепловая обработка микросом печени и индуцирование ферментативных (NADP • Н-зависимых) механизмов окисления липидов вызывает противоположный эффект – уменьшает окисление липидов в присутствии метацина.

2. Введение экспериментальным животным неостигмина на фоне гексаметония и 3-часовой голодовой нагрузки приводит к увеличению содержания диеновых конъюгатов общих липидов печени, малонового диальдегида гомогената печени; введение же метацина вызывает противоположный эффект – снижает диеновую конъюгацию и содержание ТБК-активного продукта – малонового диальдегида.

Неостигмин на фоне гексаметония уменьшает содержание гидроперекисей общих липидов печени, а метацин увеличивает их.

3. Эффекты, возникающие при введении неостигмина на фоне гексаметония и отдельно метацина, позволяют сделать заключение о проявлении реципрокности при оценке содержания продуктов ПОЛ печени.

Литература

1. Голиков С.Н., Розенгарт В.И. Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества. – Л.: Наука, 1964. – 145 с.
2. Голиков С.Н., Заугольников С.Д. Реактиваторы холинэстераз. – Л.: Наука, 1970. – 105 с.
3. 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.
4. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
5. Тиханов В.И. Влияние центральных и периферических М, Н-холиномиметиков и М, Н-холиноблокаторов на формирование холодовой адаптации : дисс. ... канд. мед. наук. – Л., 1988. – 191 с.
6. Тиханов В.И., Лосев Н.А., Доровских В.А., Решодько Д.П., и др. Изменение продуктов и суб-

стратных составляющих перекисного окисления липидов в ткани печени на фоне холодовой нагрузки и введении непрямых мускаринчувствительных и никотинчувствительных холиномиметиков // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2013. – № 50. – Р. 61-67.

7. Тиханов В.И., Лосев Н.А., Доровских В.А., Решодько Д.П., Тиханов И.В., Анохина Р.А., Rogovchenko E.G. Сравнение окислительной активности прозерина при кратковременной холодовой нагрузке *in vivo* и *in vitro* // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2013. – № 49. – Р. 77-81.

8. Marnet L.J. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde // Mutat. Res. – 1999. – Vol. 424, № 1-2. – Р. 83-95.

Literature

1. Golikov S.N., Pozengart V.I. Cholinesterases and anticholinesterase agents. – L.: Science, 1964. – P. 145.
2. Golokov S.N., Zaugolnikov S.D. Reactivators of cholinesterases. – L.: Science, 1970. – P. 105.
3. 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.
4. Rebrova O.Yu. Statistical analysis of medical data. – M.: MediaSphera, 2002. – P. 312.
5. Tikhanov V.I. Influence of central and peripheral M-, N-cholinomimetics and M-, N-anticholinergic drugs on formation of adaptation to cold. : author's thesis of Candidate of Medical Science. – L., 1988. – P. 191.

6. Tikhanov V.I., Losev N.A., Dorovskikh V.A., Reshodko D.P., Tikhanov I.V., Anokhina R.A., Rogovchenko E.G. 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.

7. Tikhanov V.I., Losev N.A., Dorovskikh V.A., Reshodko D.P., Tikhanov I.V., Anokhina R.A., Rogovchenko E.G. Comparison of oxidative activity of proserin under conditions of cold stress *in vivo* and *in vitro* // Bulletin of physiology and pathology of respiration. – 2013. – Vol. 49. – P. 77-81.

8. Marnet L.J. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde // Mutat. Res. – 1999. – Vol. 424, № 1-2. – P. 83-95.

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.