



*Российская Академия Наук*

Отделение медицинских наук

В.И.Тиханов, П.Д.Шабанов

# **НЕ-НЕЙРОНАЛЬНЫЙ АЦЕТИЛХОЛИН ПЕЧЕНИ**

Москва  
2020

УДК 615.275.4:612.35:577.352.335  
ББК 52.81.711.1

*Рецензенты:*

*Петров Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии» ФМБА РФ, Санкт-Петербург;*  
*Тюренокв Иван Николаевич, заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и биофармации ФУВ ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Волгоград.*

**Тиханов В.И., Шабанов П.Д. Не-нейрональный ацетилхолин печени.**  
М.: РАН. – 2020. – 260 с.: 25 ил.

ISBN 978-5-907-036-73-4

Монография посвящена проблемам изучения функций не-нейронального ацетилхолина печени. Целью работы явился экспериментальный систематический фармакологический анализ свободно-радикального окисления липидов печени холинотропными средствами при остром (3 ч) и хроническом (5 дней) холодовом воздействии. Показано, что обменные процессы в печени, ответственные за формирование продуктов, субстратных составляющих перекисного окисления липидов (ПОЛ), активно регулируются посредством холинергических механизмов как в обычных условиях, так и при холодовых нагрузках. Добавление к инкубационной среде холинотропных фармакологических агентов, активирующих холинергические структуры (ацетилхолин, никотин, пилокарпин, неостигмин) либо их угнетающих (гексаметоний, метацин, атропин), оказывает разнонаправленное влияние на окисление липидов микросом печени при индуцировании ПОЛ ферментативными и неферментативными механизмами. Эта закономерность воспроизводится и при исследованиях *in vivo*. Использование широкого набора молекулярных мишеней (более 20 показателей ПОЛ) позволяет оценить регуляторные холинергические механизмы отдельных компонентов холинергической системы (мускарино- и никотиночувствительный) в отношении регуляции ими свободно-радикальных процессов ПОЛ печени при срочной (3 ч) и хронической (5 суток) холодовой адаптации. При срочной (3 ч охлаждения) или хронической (5 суток) холодовой адаптации введение животным (крысам) комбинации фармакологических агентов, приводящей к активации М-холинергического звена холинергической системы (гексаметоний + неостигмин либо отдельно пилокарпин), увеличивает, а блокада М-холинергических механизмов (применение метацина или атропина), напротив, ослабляет выраженность формирования продуктов и субстратных составляющих ПОЛ печени. Подобные изменения происходят и в системе *in vitro* при добавлении в инкубационную среду фармакологических агентов, стимулирующих М-холинергическое звено холинергической регуляции (гексаметоний + неостигмин либо отдельно пилокарпин) либо ее блокирующих (метацин, атропин). *In vivo* и *in vitro* М- и Н-холинергические механизмы не только регулируют образование продуктов и субстратных составляющих ПОЛ печени при срочной (3 ч охлаждения) или хронической (5 суток) холодовой адаптации через соответствующие рецепторные образования плазматических мембран гепатоцитов печени, но и работают по принципу взаимодополнительности или даже отчасти реципрокности, когда активация М-холинергического звена холинергической системы затормаживает активность Н-холинергического компонента системы, и наоборот.

Для физиологов, фармакологов, врачей общей практики, всех, кто интересуется проблемами нейрональной и не-нейрональной регуляции функций организма.

ISBN 978-5-907-036-73-4

© Тиханов В.И., Шабанов П.Д., 2020

# СОДЕРЖАНИЕ

<b>УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ</b> .....	9
<b>ПРЕДИСЛОВИЕ</b> .....	12
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	18
<b>Глава 1. ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)</b> .....	21
<b>1.1. Стресс-факторы окружающей среды. Холодовая нагрузка и участие     стресс-системы. Виды стресса, окислительный стресс. Холинотропные     средства и продукты окислительного стресса</b> .....	21
<b>1.2. Холинореактивные структуры плазматических мембран. Влияние     холинотропных средств на изменения содержания продуктов     перекисного (свободно-радикального) окисления липидов</b> .....	23
<b>1.2.1. Мускарино-чувствительные ацетилхолиновые рецепторы         (связь с G-белками, фосфолипазами плазматических мембран клеток,         внутриклеточными мессенджерами). Мускарино-тропные средства и         продукты перекисного (свободно-радикального) окисления липидов</b> .....	23
<b>1.2.2. Никотино-чувствительные ацетилхолиновые рецепторы         плазматических мембран. Влияние никотина на содержание         малонового диальдегида, ферментов окислительного стресса</b> .....	27
<b>1.2.2.1. Окислительные соединения листьев табака, окислительные             метаболиты никотина в организме животных</b> .....	29
<b>1.2.2.2. Липидно-белковые связи (аддукты Михаэлиса, основания             Шиффа) и агонисты холинергических структур плазматических             мембран</b> .....	31
<b>1.3. Влияние непрямого М, Н-холиномиметика неостигмина, прямого     М-холиномиметика пилокарпина на содержание продуктов перекисного     (свободно-радикального) окисления липидов крови, ткани лёгкого     миокарда животных периода 14 дней охлаждения. Индекс деформации     эритроцитов периода формирования холодовой адаптации и введении     животным пилокарпина, атропина</b> .....	32
<b>1.4. Формирование продуктов перекисного (свободно-радикального)     окисления липидов в тканевой среде</b> .....	34
<b>1.4.1. Первичные продукты перекисного (свободно-радикального)         окисления липидов и активация неферментативных механизмов         окисления. Циклические структуры в продуктах перекисного         окисления липидов</b> .....	35
<b>1.4.2. Альдегиды липидов мембран при активации перекисного         (свободно-радикального) окисления. Влияние холинотропных средств         на содержание альдегидных продуктов окисления липидов</b> .....	36

1.4.2.1. Акролеин (пропеналь, охо-diene), глиоксаль .....	36
1.4.2.2. Малоновый диальдегид .....	37
1.4.2.3. 4-Гидроксиалкены (4-hydroxyalkenals) .....	38
1.4.2.4. Изопростановая часть пути формирования циклических альдегидов .....	38
1.4.3. Продукты перекисного (свободно-радикального) окисления липидов и ферментативные механизмы окисления липидов .....	39
1.4.3.1. Продукты перекисного (свободно-радикального) окисления липидов при активации циклооксигеназ (простагландин-синтазы), связь с механизмами GPCRs плазматической мембраны клетки .....	39
1.4.3.2. Продукты перекисного (свободно-радикального) окисления липидов при активации липооксигеназ (участие протеин-киназы C; фосфатидил-инозитол-3-киназа) .....	41
1.4.3.3. Цитохром P-450 в формировании продуктов перекисного (свободно-радикального) окисления липидов, участие пилоткарпина в иницировании ПОЛ цитохромом P-450 .....	42
<b>1.5. Влияние холинотропных средств на изменение содержания субстратных составляющих перекисного (свободно-радикального) окисления липидов .....</b>	<b>44</b>
1.5.1. Молекулярный кислород; активные формы кислорода; 2,3-ДФГ в эритроцитах крови животных и холинотропные средства .....	44
1.5.2. Холинотропные средства и свободные жирных кислот крови; связь эйкозаноидов, оксипинов с GPCRs плазматической мембраны клетки .....	47
1.5.3. Резюме к главе 1 .....	48
<b>Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>50</b>
<b>2.1. Материалы .....</b>	<b>50</b>
<b>2.2. Реактивы, фармакологические препараты, фармакологические методы .....</b>	<b>51</b>
2.2.1. Реактивы .....	51
2.2.2. Фармакологические агенты .....	52
2.2.3. Фармакологические методы .....	52
2.2.4. Расчёт концентрации фармакологического агента, применяемого in vitro и in vivo .....	58
<b>2.3. Препаративные методы .....</b>	<b>58</b>
2.3.1. Приготовление гомогената печени .....	58

2.3.2. Экстракция общих липидов из гомогената печени .....	58
2.3.3. Выделение фракции свободных жирных кислот печени из общих липидов печени .....	59
2.3.4. Выделение мембран эндоплазматического ретикулула гепатоцитов (микросомы печени) .....	59
2.3.5. Метилирование жирных кислот в общих липидах и фракции свободных жирных кислот печени .....	60
2.3.6. Получение золя кремневой кислоты .....	60
<b>2.4. Экспериментальные методы .....</b>	<b>61</b>
2.4.1. Введение экзогенного ацетилхолина в ткань печени <i>in situ</i> .....	61
2.4.2. Индуцирование неферментативного (аскорбатзависимого) и ферментативного (NADP•H-зависимого) перекисного (свободно-радикального) окисления липидов в мембранах эндоплазматического ретикулула гепатоцитов (микросомы печени) <i>in vitro</i> .....	61
2.4.3. Определение окислительной активности фармакологических агентов неостигмина, пилокарпина, атропина, метацина, никотина, гексаметония <i>in vitro</i> .....	62
<b>2.5. Аналитические методы .....</b>	<b>63</b>
2.5.1. Диеновая конъюгация общих липидов, фракции свободных жирных кислот печени .....	63
2.5.2. Гидроперекиси общих липидов, фракции свободных жирных кислот печени .....	63
2.5.3. Малоновый диальдегид гомогената печени .....	64
2.5.4. Белок микросом печени .....	65
2.5.5. Катехоламины гомогената печени .....	65
2.5.6. Определение молекулярного кислорода гомогената печени .....	65
2.5.7. Оценка способности гомогената печени продуцировать активные формы кислорода .....	67
2.5.8. Йодное число общих липидов, фракции свободных жирных кислот печени .....	70
2.5.9. Содержание 2,3-ДФГ в эритроцитах .....	70
2.5.10. Метилловые эфиры жирных кислот .....	71
2.5.11. $\alpha$ -Токоферол общих липидов печени .....	71
2.5.12. Статистическая обработка полученных результатов .....	71

<b>Глава 3. ВЛИЯНИЕ ПРЯМЫХ И НЕПРЯМЫХ ХОЛИНОМИМЕТИКОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОДУКТОВ И СУБСТРАТНЫХ СОСТАВЛЯЮЩИХ ПОЛ ПЕЧЕНИ КРЫС IN VIVO И IN VITRO ПОСЛЕ 3-ЧАСОВОЙ ХОЛОДОВОЙ НАГРУЗКИ</b> .....	72
<b>3.1. Влияние неостигмина на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ после 3 часов холодной нагрузки</b> .....	72
<b>3.2. Результаты ПОЛ, полученные in vitro индуцированием неферментативных, ферментативных механизмов окисления липидов микросом печени и присутствии неостигмина</b> .....	81
<b>3.3. Влияние ацетилхолина ткани печени на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени</b> .....	83
<b>3.4. Индуцирование ПОЛ микросом печени in vitro в присутствии ацетилхолина</b> .....	88
<b>3.5. Резюме к главе 3</b> .....	91
<b>Глава 4. ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИЙ ХОЛИНОМИМЕТИКОВ И ХОЛИНОБЛОКАТОРОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОДУКТОВ И СУБСТРАТНЫХ СОСТАВЛЯЮЩИХ ПОЛ ПЕЧЕНИ КРЫС IN VIVO И IN VITRO ПОСЛЕ 3-ЧАСОВОЙ И 5-ДНЕВНОЙ ХОЛОДОВОЙ НАГРУЗКИ</b> .....	93
<b>4.1. Влияние гексаметония на содержание продуктов ПОЛ печени после 3 часов охлаждения животных. Сопоставление результатов, полученных in vivo, с результатами ПОЛ микросом печени в присутствии гексаметония in vitro</b> .....	94
<b>4.2. Результаты введения неостигмина на фоне гексаметония и оценка содержания продуктов ПОЛ печени после 3 часов охлаждения животных. Сопоставление результатов ПОЛ, полученных in vivo, с окислением липидов микросом печени in vitro в присутствии комбинации неостигмина и гексаметония</b> .....	97
<b>4.3. Результаты ПОЛ микросом печени, полученные in vitro и присутствии метацина</b> .....	101
<b>4.4. Содержание продуктов ПОЛ печени при введении животным неостигмина на фоне гексаметония и отдельно метацина после 3 часов холодной нагрузки (реципрокность)</b> .....	103
<b>4.5. Заключение по результатам введения животным гексаметония, введения животным неостигмина на фоне гексаметония, введения отдельно метацина и оценка содержания продуктов ПОЛ печени после 3-часового охлаждения животных. Заключение по результатам ПОЛ, полученных in vitro и отдельном присутствии гексаметония, комбинации неостигмина и гексаметония, отдельного присутствия метацина в инкубационной среде</b> .....	106

<b>4.6.</b> Влияние пилокарпина, атропина на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени, влияние на условия, способствующие развитию ПОЛ печени после 5 дней охлаждения животных. Сопоставление результатов окисления липидов печени, полученных <i>in vivo</i> , с окислением липидов микросом печени <i>in vitro</i> и присутствии пилокарпина или атропина .....	107
<b>4.7.</b> Заключение о влиянии пилокарпина и атропина на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ, о влиянии на изменение условий, способствующих развитию ПОЛ печени <i>in vivo</i> на фоне 5 дней охлаждения животных .....	124
<b>4.8.</b> Результаты индуцирования ПОЛ микросом печени <i>in vitro</i> неферментативными (аскорбатзависимыми) и ферментативными (NADP•H-зависимыми) механизмами и присутствии пилокарпина и атропина .....	126
<b>4.9.</b> Заключение по результатам ПОЛ печени, полученных после введения животным пилокарпина и атропина после 5 дней холодовой нагрузки; заключение по окислению липидов микросом печени в присутствии пилокарпина и атропина <i>in vitro</i> .....	130
<b>4.10.</b> Резюме к главе 4 .....	131
<b>Глава 5.</b> ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ РЕЦИПРОКНОСТИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ ОЦЕНКЕ ВЛИЯНИЯ КОМБИНАЦИЙ ХОЛИНОМИМЕТИКОВ И ХОЛИНОБЛОКАТОРОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОДУКТОВ И СУБСТРАТНЫХ СОСТАВЛЯЮЩИХ ПОЛ ПЕЧЕНИ КРЫС <i>IN VIVO</i> И <i>IN VITRO</i> ПОСЛЕ 3-ЧАСОВОЙ И 5-ДНЕВНОЙ ХОЛОДОВОЙ НАГРУЗКИ .....	134
<b>5.1.</b> Влияние метацина на содержание продуктов ПОЛ печени на фоне 3-часового охлаждения животных. Сопоставление результатов ПОЛ, полученных <i>in vivo</i> , с ПОЛ микросом печени, индуцированного <i>in vitro</i> в присутствии метацина .....	135
<b>5.2.</b> Влияние неостигмина на фоне метацина в оценке содержания продуктов ПОЛ печени после 3 часов охлаждения животных. Сопоставление результатов ПОЛ, полученных <i>in vivo</i> , с окислением липидов микросом печени в присутствии неостигмина, метацина инкубационной среды .....	140
<b>5.3.</b> Результаты окисления липидов микросом печени, проведенные <i>in vitro</i> и присутствии гексаметония. Сопоставление данных, полученных <i>in vitro</i> , с данными влияния гексаметония на содержание продуктов ПОЛ печени после 3-часового охлаждения животных .....	144
<b>5.4.</b> Содержание продуктов ПОЛ печени при введении животным неостигмина на фоне метацина и отдельного введения животным гексаметония после 3 часов охлаждения животных (эффект реципрокности) .....	145

5.5. Заключение по результатам введения отдельно метацина, неостигмина на фоне метацина и отдельного введения гексаметония при оценке содержания продуктов ПОЛ после 3-часового охлаждения животных. Заключение по сопоставлению данных, полученных <i>in vivo</i> , с данными <i>in vitro</i> в присутствии метацина, комбинационного присутствия неостигмина, метацина и отдельного присутствия гексаметония .....	149
5.6. Влияние никотина, гексаметония на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени <i>in vivo</i> и влияние на изменение условий, способствующих росту ПОЛ печени периода 5 дней охлаждения животных. Сопоставление результатов окисления липидов печени, полученных <i>in vivo</i> с окислением липидов микросом печени <i>in vitro</i> в присутствии никотина, гексаметония .....	151
5.7. Заключение о результатах влияния никотина, гексаметония на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени, условий, способствующих развитию ПОЛ печени после 5 дней охлаждения животных .....	180
5.8. Результаты индуцирования ПОЛ микросом печени <i>in vitro</i> неферментативными (аскорбатзависимыми) и ферментативными (NADP•Н-зависимыми) механизмами в присутствии никотина, гексаметония .....	182
5.9. Заключение по сопоставлению результатов ПОЛ печени, полученных при введении животным никотина и гексаметония после 5 дней охлаждения, и заключение по окислению липидов микросом печени в присутствии никотина и гексаметония <i>in vitro</i> .....	190
5.10. Резюме к главе 5 .....	192
<b>Глава 6. РЕЦИПРОКНОСТЬ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МЕЖДУ MACHRS И NACHRS КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ПОЛ ЧЕРЕЗ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ .....</b>	<b>196</b>
<b>Глава 7. НЕ-НЕЙРОНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПОЛ ПЕЧЕНИ .....</b>	<b>216</b>
7.1. Фармакологическая регуляция ПОЛ печени. Основные итоги выполненной работы .....	216
7.2. Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки проблемы .....	218
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>220</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>223</b>

## УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

**АФК** – активные формы кислорода

**АХ** – ацетилхолин

**в/бр** – внутрибрюшинно

**ГП** – гидроперекиси

**ГПГ** – гидроперекисные группы

**ДА** – дофамин

**ДАГ** – диацилглицерин

**ДК** – диеновые конъюгаты

**2,3-ДФГ** – 2,3-дифосфоглицерат

**ЖК DGLA** – жирная кислота  $\Delta 11,14,17$  C<sub>20:3</sub> эйкозотриеновая (digomo- $\gamma$ -linolenic acid, DGLA)

**ЖК Арахис** – жирная кислота  $\Delta 5,8,11,14$  C<sub>20:4</sub> эйкозатетраеновая (Арахис)

**ЖК Эйкоза** – жирная кислота  $\Delta 5,8,11,14,17$  C<sub>20:5</sub> эйкозапентаеновая (Эйкоза)

**ЖК-ты** – жирные кислоты

**ИК спектрофотометрия** – инфракрасная спектрофотометрия

**Ин** – 1,4,5-Ф3 – инозит 1,4,5-трифосфат

**ИЭЯ** – измерительная электролитическая ячейка

**КА** – катехоламины

**МДА** – малоновый диальдегид

**МПО** – медиальная преоптическая область

**МЭЖК** – метиловые эфиры жирных кислот

**МЭРГ** – мембраны эндоплазматического ретикулула гепатоцитов

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – гидроперекись водорода

**НА** – норадреналин

**НЭЖК** – неэстерифицированные жирные кислоты

**ОЛ** – общие липиды

**ПОЛ** – перекисное (свободно-радикальное) окисление липидов

**ПР** – пероксильный радикал

**САС** – симпатoadреналовая система

**СЖК** – свободные жирные кислоты

**СОВНС** – симпатический отдел вегетативной нервной системы

**СРО** – свободно-радикальное окисление

**ТМД** – трансмембранные домены

**ТСХ** – тонкослойная хроматография

**ТФК** – триплетная форма кислорода

**Фи** – фосфатидилинозит

**Фтд Ин** – 4,5-Ф2 -фосфатидилинозит

**ХОБЛ** – хроническая обструктивная болезнь лёгких

**ХРС** – холинореактивные структуры

**AChE** – ацетилхолинэстераза

**AChRs** – ацетилхолиновые рецепторы

**BChE** – бутирилхолинэстераза

**COX<sub>1</sub>** – циклооксигеназа-1

**CYP<sub>450</sub>** – цитохром P<sub>450</sub>

**FMO** – флавомонооксигеназа

**Hb** – гемоглобин

**HETE** – hydroeicosatetraenoic

**HpETE** – hydro-peroxyeicosatetraenoic

**11-HETE** – 11-hydroeicosatetraenoic

**11 R-HpETE** – 11R-hydroperoxyeicosatetraenoic

**15-HETE** – 15-hydroeicosatetraenoic

**15 S-HpETE** – 15 S-hydro-peroxyeicosatetraenoic

**19 HEТЕ** – 19-hydroxyeicosatetraenoic

**20 HEТЕ** – 20-hydroxyeicosatetraenoic

**4 HNE** – 4-hydroxyl-2E-nonenal

**4-ONE** – trans-4-охо-2-nonenal

**4- HHE** – 4-hydroxy-2E-hexenal

**4-OHE** – trans-4-охо-2-hexenal

**4 – HDDE** – 4-hydroxy-2 E,6Z-dodecadienal

**4HP2HNE** – 4-hydroperoxy-2E-nonenal

**IsoFs** – изофураны

**IsoKs** – изокетали ( $\gamma$ -ketoaldehydes)

**IsoPs** – изопростаны

**LOX** – липооксигеназа

**mAChRs** – мускарино-чувствительные ацетилхолиновые рецепторы

**nAChRs** – никотино-чувствительные ацетилхолиновые рецепторы

**NADP+** – окисленный никотинамидадениндинуклеотид фосфат

**NADP • Н** – восстановленный никотинамидадениндинуклеотид фосфат

**NOS** – синтаза оксида азота

**OxPLs** – оксифосфолипиды

**PCET (proton coupled electron transfer)** – передача протона связанного с движением электрона

**PEPC** – palmitoyl-2-(5,6-epoxycyclopentenone)-sn-glycero-3-phosphocholine  
**PEIPC** – palmytoyl-2-(5,6-epoxyisoprostane E2)-sn-glycero-3-phosphocholine  
**PGD<sub>2</sub>** – простагландин D<sub>2</sub>  
**PGE<sub>2</sub>** – простагландин E<sub>2</sub>  
**PGF<sub>2α</sub>** – простагландин F<sub>2α</sub>  
**PGH<sub>2</sub>** – простагландин H<sub>2</sub>  
**PGI<sub>2</sub>** – простагландин I<sub>2</sub>  
**PGs<sub>1</sub>** – простагландины<sub>1</sub>  
**PGs<sub>2</sub>** – простагландины<sub>2</sub>  
**PI3K** – фосфатидил-инозитол-3-киназа  
**PKC** – протеинкиназа C  
**PLA<sub>2</sub>** – фосфолипаза A<sub>2</sub>  
**PLC** – фосфолипаза C  
**PLD** – фосфолипаза D  
**POVPC** – palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycerol-3-phosphocholine  
**PUFAs** – полиненасыщенные жирные кислоты  
**SOD** – супероксиддисмутаза  
**TXB** – тромбоксан B  
**XD** – ксантиндегидрогеназы  
**XO** – ксантинооксидазы  
**β-scission** – β-расщепление  
**COX<sub>2</sub>** – циклооксигеназа-2  
**TXA<sub>2</sub>** – тромбоксан A<sub>2</sub>

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Представлять работу, которая не совсем, точнее совсем не укладывается в традиционные представления о функциях ацетилхолина (АХ) в организме, вовсе не просто. Согласно современным представлениям, АХ – это органическое химическое вещество, которое функционирует в головном мозге и теле многих типов животных и человека в качестве нейромедиатора, то есть химического посредника, высвобождаемого нервными клетками для передачи сигналов другим клеткам, прежде всего, возбудимым тканям – нейронам, мышечным и железистым клеткам. Свое имя АХ получил исходя из химической структуры: это эфир уксусной кислоты и холина.



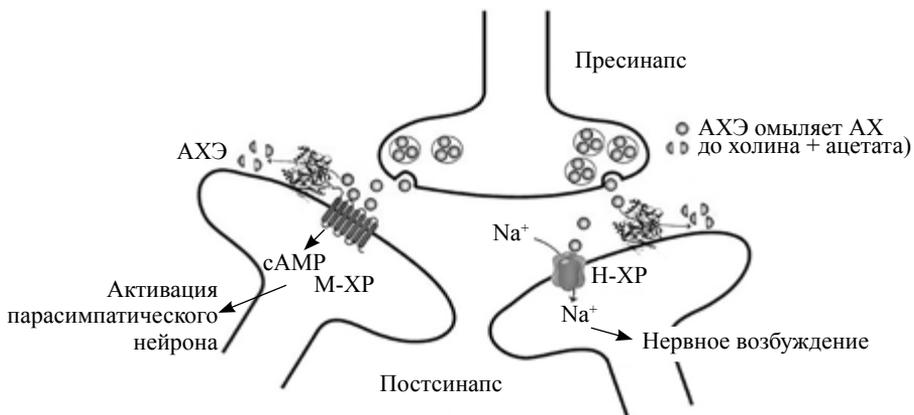
Схема синтеза ацетилхолина

АХ рассматривается как основной нейромедиатор в холинергических нейронах парасимпатической нервной системы, преганглионарных нейронах симпатической нервной системы, нервно-мышечной передаче и в головном мозге. Эти представления стали распространяться с 1921 года, когда Отто Лёви, профессору фармакологии из университета г. Грац (Австрия) экспериментально удалось доказать высвобождение АХ из окончаний блуждающего нерва, иннервирующего сердце лягушки, при его раздражении [7]. Хотя еще в 1914 г. Генри Дейл [5] описал эффекты АХ на различные типы периферических синапсов, а также отметил, что он снижает кровяное давление кошек с помощью подкожных инъекций даже в дозах порядка одного нанограмма. Позже, в 1936 г. Г. Дейл и О. Лёви получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за изучение роли АХ в передаче нервного импульса. С тех времен (начало 1920-х гг.) представления о нейромедиации и АХ, как основном нейромедиаторе, в течении почти 100 лет доминируют в нейрофармакологии.

Однако этот традиционный аспект изучения роли АХ в функциях организма не является единственным при его изучении. АХ был идентифицирован и изучен и на клеточных системах, например, клетках нейрального происхождения и микробах. В последнее время ферменты, связанные с его синтезом, деградацией и клеточным поглощением, были прослежены до ранних истоков одноклеточных эукариот. Так, в организме простейших патогенных микроорганизмов, например, *Acanthamoeba spp.*, показано наличие АХ, который обеспечивает рост и пролиферативные сигналы через мембрану, расположенную в гомологе M1-мускаринового рецептора на

мембране микроорганизма. АХ используется организмами во всех областях жизни для различных целей. Более того, считается, что холин, предшественник АХ, был использован одноклеточными организмами миллиарды лет назад для синтеза фосфолипидов клеточной мембраны. После развития транспортеров холина, обилие внутриклеточного холина создало предпосылки для холина быть включенным в другие направления биосинтеза, включая продукцию АХ. АХ используется бактериями, грибами и различными другими животными. Многие из применений АХ зависят от его действия на ионные каналы через G-белки.

Два основных типа рецепторов АХ, мускариновые и никотиновые рецепторы (рис. 1), конвергентно эволюционировали, чтобы быть чувствительными к нейромедиатору АХ. Это означает, что вместо того, чтобы развиться из общего гомолога, эти рецепторы развились из отдельных семейств рецепторов. Считается, что семейство никотиновых рецепторов существует уже более 2,5 миллиардов лет. Кроме того, мускариновые рецепторы, как полагают, разошлись с другими G-белками, по крайней мере, полмиллиарда лет назад. Обе эти рецепторные группы развили многочисленные подтипы с уникальными свойствами высокого сродства лигандов к рецептору АХ и другими аспектами внутриклеточного сигналинга. Разнообразие типов рецепторов позволяет АХ создавать различные реакции в зависимости от того, какие типы рецепторов активируются, и позволяет АХ динамически регулировать физиологические процессы.



**Рис. 1.** Действие ацетилхолина на мускарино- и никотиночувствительные рецепторы

АХ связывается с мускариночувствительными рецепторами АХ (левая часть схемы) на парасимпатических нейронах, контролируя секреторные ответы (слюноотечение, отделение слезы), мочеиспускание, перистальтику желудочно-кишечного тракта, сердечные сокращения, дыхание (бронхоспазм).

АХ связывается с никотиночувствительными рецепторами на холинергических нейронах (правая часть схемы), контролируя процессы памяти, двигательные функции, передачу нервного сигнала.

В 1990-х гг. активизировались исследования по изучению не-нейронального действия АХ. Стали регулярно проводиться международные симпозиумы и конференции на эту тему. Наиболее значимые аспекты этой проблемы были связаны с недостаточным объяснением многих факторов участия АХ в регуляции отдельных клеточных систем, например, в зародышевых образованиях нервной ткани в период формирования головного мозга в раннем онтогенезе, когда синаптогенез не завершен [3], действия АХ на клетки крови, иммунные клетки (рис. 2), паренхиматозные органы (печень, селезенка), где отсутствуют типичные рецепторы АХ нейронального типа, наконец, факты, малообъяснимые с точки зрения участия АХ как регулятора физиологических функций, например, участия АХ в канцерогенезе (рис. 3), выздоровления после отравления необратимыми антихолинэстеразными ядами (типа зарина, зомана, табуна), используемыми в заведомо летальных дозах без фармакологической защиты в виде блокады М-холинорецепторов [2] и т. д.

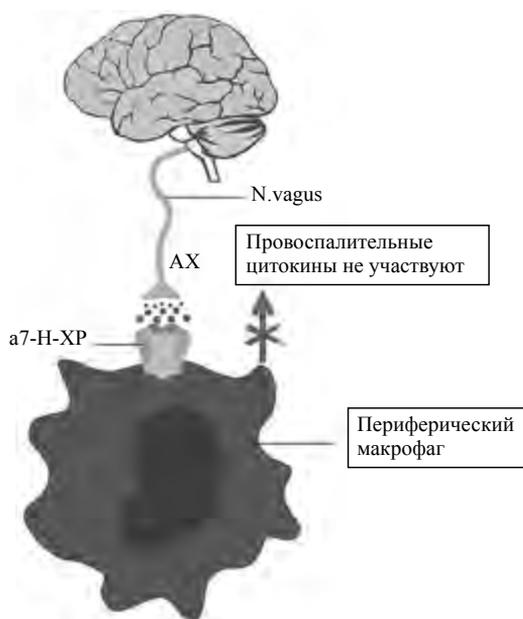
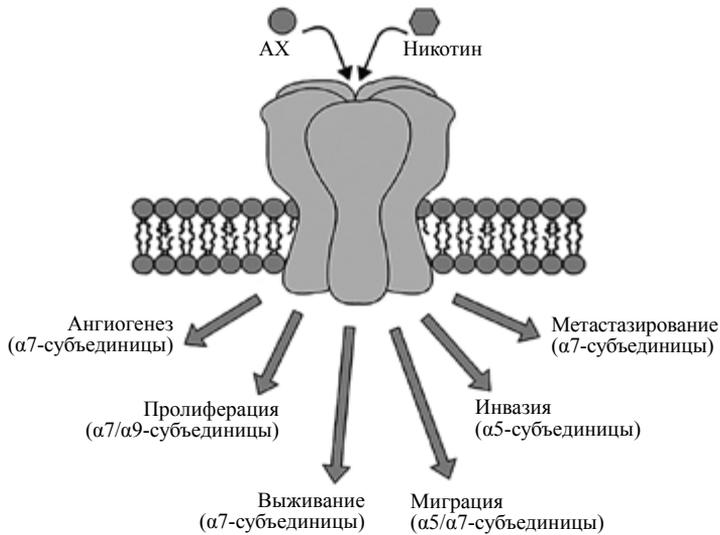


Рис. 2. Участие АХ в регуляции иммунного ответа

Все эти факты и экспериментальные данные оказались мало систематизированными. В некоторых областях, например, иммунологии, они активно развиваются и находят не только поддержку, но и многочисленных сторонников [6]. В других областях, например, онкологии, они оказались мало востребованными, хотя фактический материал об использовании холинотропных препаратов для лечения опухолей накапливался в течение десятилетий и продолжает накапливаться [1]. В такой области, как акушерство и репродуктология, холинореактивность эритроцитов часто



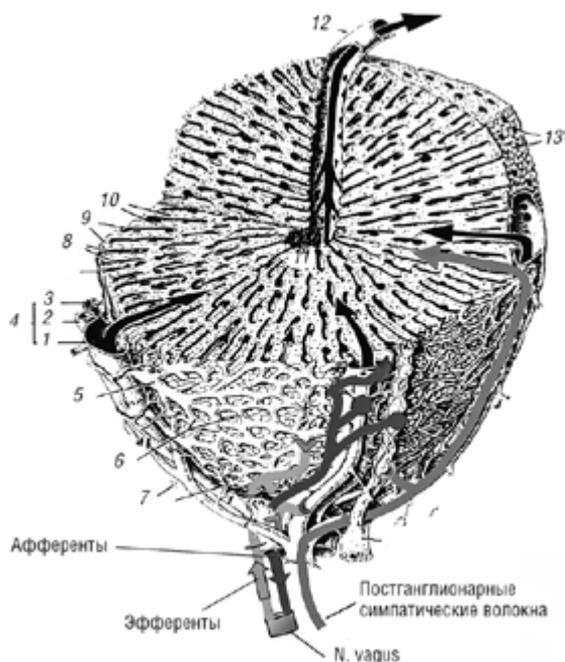
**Рис. 3.** Участие Н-холинорецепторов (Н-ХР) в не-нейрональной регуляции канцерогенеза

рассматривается как рутинный метод оценки функционального состояния беременных и рожениц [4].

Подобных примеров можно приводить достаточно много, хотя они и не решают основной вопрос отношения к не-нейрональным холинергическим механизмам регуляции физиологических функций. Поэтому мы представили еще один аспект изучения не-нейрональной функции АХ в отношении функций печени. Предлагаемая к рассмотрению работа относится к категории фундаментальных разработок, пытающихся осмыслить, как и посредством каких механизмов можно воздействовать на не-нейрональные рецепторы АХ, в какой степени расхожие представления о классической холинергической передаче в нервной системе можно перенести и на функционирование не-нейрональных систем АХ в организме. У авторов свой взгляд на проблему, основанный на анализе многочисленных (более 20) внутриклеточных молекулярных событий, напрямую не связанных с рецепторами АХ. Тем не менее, авторы находят общие закономерности функционирования нейромедиаторных и не-нейрональных систем АХ, выделяет их общие свойства и, соответственно, подходы к фармакологическому воздействию на них. Такой подход, безусловно, имеет право на жизнь, он глубоко обоснован теоретически и экспериментально, и делает представленную монографию по своей сути фундаментальным трудом, направленным на решение важнейших фармакологических и практических медицинских задач.

Следует подчеркнуть, что печень сама по себе представляет уникальный орган. С одной стороны, это типичный паренхиматозный орган, место синтеза основных белков крови и других протеинов, выполняющий функцию детоксикации поступающих в организм ядов. С другой стороны, это ор-

ган, который иннервируется, как все другие органы желудочно-кишечного тракта, блуждающим нервом, следовательно, на него можно воздействовать именно этим путем. С фармакологической точки зрения это весьма важно, поскольку блуждающий нерв холинергичен по своей природе. Окончания его заканчиваются в виде неких нейросекреторных образований, выделяя АХ. Следовательно, его можно рассматривать и как аналог медиаторной системы, и как орган не-нейрональный, поскольку АХ выделяется не в синаптическую щель, а в околоклеточное пространство вблизи гепатоцитов. Более точно, речь идет об эфферентной иннервации печени, осуществляемой через блуждающий нерв. Преганглионарные волокна этого нерва оканчиваются в интрамуральных узлах в области ворот печени, постганглионарные – идут вместе с чувствительными волокнами в составе портальных каналов долевых, зональных и междольковых образований (рис. 4). Двигательные волокна (холинергические) заканчиваются на стенках венул и артериол междольковых образований. Выделяющийся АХ, вероятно, действует на рецепторные образования гепатоцитов как на их поверхности, так и внутри (например, на мембраны микросом), то есть на сугубо внутриклеточные процессы. Все эти вопросы рассматриваются в предлагаемой монографии.



**Рис. 4.** Схема вегетативной иннервации долики печени

1 – междольковые вены (претерминальные); 2 – междольковые артерии; 3 – желчные протоки (элементы триады); 4 – портальный канал; 5 – междольковая венула; 6 – венозные капилляры; 7 – артериальный капилляр; 8 – синусоидный капилляр; 9 – опоясывающая пластинка; 10 – печеночные пластинки; 11 – центральная вена; 12 – поддольковая вена; 13 – отверстия опоясывающей пластинке. (Реконструкция А.В. Дробленкова и П.С. Бобкова)

Еще один аспект, который красной нитью прослежен в настоящей работе, – это как механизмы свободно-радикального окисления печени участвуют в адаптации к холодовым нагрузкам, а также фармакологические возможности управления этими процессами посредством воздействия на рецепторы АХ печени. Этот аспект придает работе некий практический интерес и перспективу научно-практической разработки проблемы в этом направлении.

Авторы будут весьма признательны за любые критические замечания, возникшие при прочтении данной работы. Просьба вопросы и замечания направлять на кафедру госпитальной терапии с курсом фармакологии ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» МЗ РФ (675006, Амурская область, г. Благовещенск, ул. Горького, д.95, доценту Виктору Ивановичу Тиханову, e-mail: tikchanov@yandex.ru) или на кафедру фармакологии ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия» Минобороны РФ (194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, 6, профессору Петру Дмитриевичу Шабанову, e-mail: pdshabanov@mail.ru).

### *Литература к предисловию*

1. *Кокряков, В.Н.* Средство для торможения карциномы Эрлиха / В.Н. Кокряков, Н.А. Лосев, М.С. Жаркова, П.Д.Шабанов // Патент RU2538716 С2 от 10.01.2015

2. *Лосев, Н.А.* Фармакология новых холинергических средств (фармакология – клинике) / Н.А. Лосев, Н.С. Сапронов, Л.К. Хныченко, П.Д. Шабанов. – СПб.: Арт-экспресс, 2015. – 368 с.

3. *Сапронов, Н.С.* Холинергические механизмы формирования мужской половой функции / Н.С. Сапронов, А.А. Байрамов. – СПб.: Арт-экспресс, 2013. – 272 с.

4. *Циркин, В.И.* Адрено- и М-холинореактивность эритроцитов женщин на протяжении репродуктивного процесса / В.И. Циркин, А.И. Володченко, С.В. Хлыбова, С.Л. Дмитриева, О.А. Братухина // Вестник Северного (Арктического) федерального университета. Серия «Медико-биологические науки». – 2014. – №2. – С.78–90.

5. *Dale, H.H.* The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine / H.H. Dale // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1914. Vol. 6, № 2. – P. 147–190

6. *Kawashima, K.* Non neuronal cholinergic system in regulation of immune function focused on  $\alpha 7$  nAChRs / K. Kawashima, T. Fujii, Y. Moriwaki, H. Misawa, K. Horiguchi // Int. Immunopharmacol. – 2015. – Vol. 29, № 1. – P. 127-134. doi: 10.1016/j.intimp.2015.04.015. PMID 25907239.

7. *Loewi, O.* Über humorale übertragbarkeit der herznervenwirkung / O. Loewi // Pflug. Arch. Ges. Phys. (in German). – 1922. – Vol. 193, № 1. – P. 201–213. doi:10.1007/BF02331588.

## ВВЕДЕНИЕ

Длительное воздействие холода на биологическую систему является одной из мировых научных проблем [321]. Исследования, активно начатые академиком В.П. Казначеевым в 1980-х гг., формулируют идею об особом состоянии человека, находящегося в условиях длительного холода Сибири и Дальнего Востока, – синдроме полярного напряжения [51; 52; 67]. Разработка проблемы становится особо востребованной в связи с внедрением государственных программ расширения освоения районов Севера и Дальнего Востока Российской Федерации (2016-2020).

Оценка влияния холодовой нагрузки на биологические системы в эксперименте позволяет определить тонкие изменения свойств липидов мембран клеток [293; 352], температуры фазового перехода липидов [62; 63], вязкости плазматических мембран клетки [174; 353], содержания гормонов гипофизарно-надпочечниковой системы [148] и других показателей, на основании анализа которых можно сделать выводы о степени адаптации организма к воздействию низких температур.

Изменение числа двойных связей в ненасыщенных компонентах липидных структур клеточных мембран [115; 141; 241] в условиях холодовой нагрузки меняет и способность липидов клеточных мембран к одноэлектронному окислению и восстановлению [66; 133], а изменения в содержании молекулярного кислорода [65] тканей создаёт условия для подготовки и развития перекисного окисления липидов, или ПОЛ [24; 49; 407; 501].

Отмечено, что активация ПОЛ в период холодовых нагрузок сопровождается повышенной продукцией адреналина [17; 45; 60; 118]. Каналом, оказывающим влияние на содержание катехоламинов (КА), является периферическое адренергическое звено [8; 94-96].

Согласно основополагающей концепции J.H. Burn и M. Rand (1965), постулирующей присутствие холинергического компонента в периферическом адренергическом звене [190; 191], многие исследователи считают, что и холинергические механизмы биологической системы являются одним из важнейших каналов реализации стрессорных реакций и управления обменными процессами в тканях [32; 38; 39; 41]. В частности, полученные факты свидетельствуют, что в период холодовых нагрузок центральное и периферическое холинергические звенья стресс-систем влияют на изменение содержания свободных жирных кислот (СЖК) крови [30; 31; 35], изменение поглощения кислорода [117; 118], обмен моноаминов в головном мозге [24; 25], общий оксидативный и энергетический статус организма [65; 68; 127].

Традиционно участие холинергических структур в регуляции основных функций организма изучали исключительно посредством воздействия на вегетативную нервную систему, главным образом ее парасимпатическое звено [2; 3]. Этому были посвящен ряд основополагающих работ, выполненных, в основном, в 1970-80-е гг. [30; 31; 190; 191]. В последующие годы

интерес к проблеме холинергической регуляции организма при холодовом стрессе стал угасать. Это было связано, в первую очередь, с переключением исследователей на геномные механизмы регуляции через симпатические механизмы контроля вегетативных функций организма [34]. На этом основании возник определенный перекос в сторону преобладания эрготропного подхода при осуществлении холодовой адаптации, когда ведущее значение в этих процессах стали отводить не синаптотропным препаратам, а лекарственным средствам метаболического типа действия [25]. Возврат к изучению холинергических механизмов адаптации организма к широкому спектру агрессивных факторов среды (перегревание и переохлаждение, воздействие вибрации, шумов, токсинов, травма, шок и т. д.) в настоящее время вполне оправдан, поскольку холинергическая медиаторная система относится к эволюционно самым старым и самым сильным системам регуляции физиологических функций [72; 73; 75]. Вследствие этого целесообразен и вполне обоснован научный подход, ставящий вопросы, как и посредством каких механизмов холинореактивные структуры влияют на внутриклеточные обменные процессы, например, перекисное окисление липидов (ПОЛ) в печени, тем более при холодовых нагрузках.

Целью работы явился экспериментальный систематический фармакологический анализ свободно-радикального окисления липидов печени холинотропными средствами при остром (3 ч) и хроническом (5 дней) холодовом воздействии.

В задачи исследования входило:

1. Проведение фармакологического анализа с использованием разных схем введения холиномиметиков (неостигмин), холиноблокаторов (атропин, гексаметоний) и ацетилхолина (АХ) на содержание продуктов и субстратных составляющих ПОЛ печени *in vivo* и *in situ* при разных вариантах холодовой нагрузки (3 ч, 5 дней).

2. Выяснить способность к одноэлектронному окислению и восстановлению липидов микросом печени в инкубационной среде *in vitro* в присутствии разных комбинаций холинотропных препаратов (неостигмина, метацина, гексаметония, АХ) при индуцировании ПОЛ ферментативными и неферментативными механизмами.

3. На основании фармакологического анализа (пилокарпин, никотин, атропин, гексаметоний) оценить вклад периферических холинергических механизмов в регуляцию содержания продуктов и субстратных составляющих ПОЛ печени *in vivo* в период длительного (5 суток) охлаждения животных.

4. Определить способность к окислению липидов микросом печени в присутствии холинергических препаратов (пилокарпина, атропина, никотина и гексаметония) при индуцировании ПОЛ ферментативными и неферментативными механизмами *in vitro* в период длительного (5 суток) охлаждения животных.

5. На основе сопоставления результатов, полученных *in vivo* и *in vitro*, сформулировать рекомендации по оптимизации свободно-радикальных обменных процессов в печени при холодových нагрузках с помощью холинергических средств.

Методология исследования состояла в изучении перекисного (свободно-радикального) окисления в печеночных клетках животных (1860 крыс), их органеллах с определением более 20 биохимических показателей, а также фармакологическом анализе процессов ПОЛ печени *in vivo* и *in vitro* с использованием набора холинергических средств (антихолинэстеразных, холиномиметиков и холинолитиков) и моделированием ситуаций срочного (3 ч) и хронического (5 дней) переохлаждения.

# Глава 1

## ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ

### 1.1. Стресс-факторы окружающей среды. Холодовая нагрузка и участие стресс-системы. Виды стресса, окислительный стресс. Холинотропные средства и продукты окислительного стресса

Длительное и интенсивное воздействие факторов внешней среды на биологическую систему, например, тепла [138] или ультрафиолета [109], трактуется как влияние стрессоров внешней среды. Одним из таких стресс-факторов окружающей среды, оказывающих влияние на организм человека в регионах Сибири и Дальнего Востока, является длительное действие низкой температуры [44; 51; 52; 117]. Влияние холода на организм связывают с изменениями работы структурных образований кожи, слизистых оболочек, внутренних органов и относящихся к семейству TRP-ионных каналов [91; 189; 328; 329; 348; 402]. Ответ организма через TRP-ионные каналы реализуется посредством центральных (паравентрикулярные ядра гипоталамуса, группа нейронов синего пятна ядер заднего гипоталамуса), периферических (гипоталамо – гипофизарно – адреналовая ось, симпатoadреналовая система, мозговой слой надпочечников) звеньев стресс-системы [99; 100; 279; 467].

Разнообразие ответов тканей организма реализации программы стресса приводит к введению новых определений видов стрессовой реакции организма – температурный стресс [449], кислородный стресс [49], митохондриальный стресс [77], метаболический стресс [386], клеточный вид стресса [19], а окисление ненасыщенных компонентов фосфолипидов мембран клетки приводит к вводу определения и мембранный стресс [226], электрофильный стресс [290]. Новые корректировки определения феномена стресса связывают его и с процессом ПОЛ [10; 465].

Считают, что стресс, вызванный эмоционально-болевым нагрузкой, приводит к активации свободно-радикального окисления (СРО) липидов, что и сопровождается увеличением содержания гидроперекисей жирных кислот (ГП ЖК), сопровождается появлением иминовых оснований Шиффа [85; 86].

Предполагают, что первопричиной подобных реакций является продукция катехоламинов (КА), превышающая нормальный уровень циркуляции КА в крови в 5–10 раз [10]. Отмечено, что и при внутрибрюшинном (в/бр)

введении КА происходит активация СРО липидов сердца, печени, скелетной мускулатуры [80; 81], при этом выявляют формирование язвенного поражения слизистой желудка, связанное с изменением содержания норадреналина (НА), приводящее к увеличению содержания малонового диальдегида (МДА) [72].

Изменение содержания продуктов ПОЛ проявлением феномена стресса позволяет назвать данное явление и окислительным стрессом [158; 279; 449; 465], хотя на сегодняшний день принято считать, что понимание феномена окислительного стресса подразумевает нарушение баланса между системой прооксидантов и антиоксидантной системой защиты организма [105].

Обозначая участие холинергических структур плазматических мембран клеток в окислительном стрессе, отмечается, что увеличение содержания ацетилхолина (АХ) тканей меняет течение окислительного стресса [413].

С изменением активности ферментов ацетилхолинэстеразы (АChE), бутирилхолинэстеразы (BChE) ткани мозга, эритроцитов плазмы крови при введении антихолинэстеразных веществ, отмечают увеличение содержания пероксидов липидов вышеперечисленных тканей [447], но публикуются и иные данные, свидетельствующие, что введение галантамина, накапливающего антихолинэстеразными механизмами эндогенный АХ, препятствует окислительному разрушению липидов ткани мозга [479].

При этом данные литературы отмечают, что ареколин, увеличивающий содержание АХ ткани мозга способствует включению ЖК  $\Delta 5,8,11,14 C_{20:4}$  эйкозатетраеновой (ЖК Арахис), рассматриваемой как субстрат окислительного стресса, в структуры липидов ЦНС [161; 224].

Экспериментально показано, что модели центральных и периферических М,Н-холиномиметиков, центральные и периферические М,Н-холинолитики при длительной холодовой нагрузке влияют на содержание катехоламинов крови [117], и данный вид холодовой нагрузки изменяет содержания продуктов ПОЛ тканей животных [59-61].

К тому же о влиянии холинергических структур ткани желудка на нормализацию содержания НА и МДА стенки желудка свидетельствуют факты применения блокады периферических М-холинорецепторов (mAChRs) и одновременной стимуляцией периферических Н-холинорецепторов (nAChRs) [72].

Поэтому выстраиванию понимания механизмов формирования ПОЛ, причин изменения содержания продуктов ПОЛ, изменения субстратных составляющих ПОЛ, причин изменений условий, способствующих формированию ПОЛ периода холодовых нагрузок и влиянию на них фармакологических агентов, работающих с холинергическими структурами плазматических мембран клеток, и будут посвящены следующие разделы литературного обзора.

## 1.2. Холинореактивные структуры плазматических мембран. Влияние холинотропных средств на изменения содержания продуктов перекисного (свободно-радикального) окисления липидов

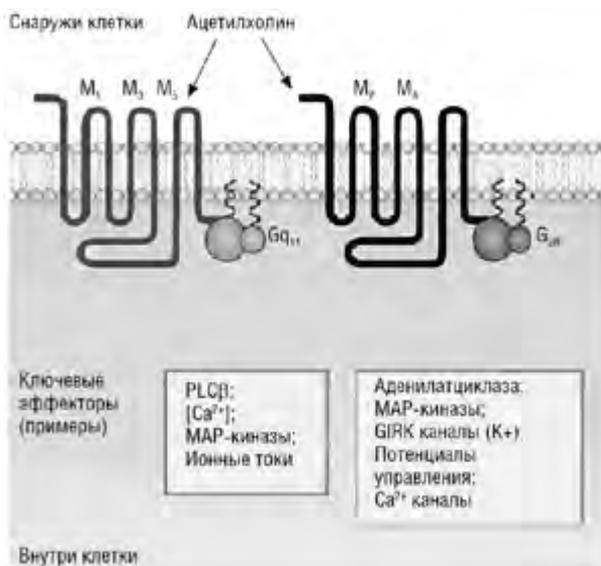
Считается, что функцией рецепторных белков плазматической мембраны клеток, связанных работой с АЦХ, является феномен опознания [48]. Классическими представителями холинорецепторов (AChRs) плазматической мембраны клеток являются mAChRs и nAChRs [2; 4]. Принято считать, что функция узнавания холинорецепторных белков плазматических мембран медиаторами, фармакологическими лигандами активацией ПОЛ нарушается [168; 266; 306; 420].

### 1.2.1. Мускариночувствительные ацетилхолиновые рецепторы (связь с G-белками, фосфолипазами плазматических мембран клеток, внутриклеточными мессинджерами). Мускаринотропные средства и продукты перекисного (свободно-радикального) окисления липидов

Белки плазматической мембраны клеток, стимулируемые мускарином, АХ и блокируемые атропином, определяются как mAChRs [37; 220]. На сегодняшний день аббревиатура mAChRs плазматической мембраны клеток подразумевает высококодифференцированный субклеточный трансмембранный протеин, «узнающий» механизмом связывания эндогенный АХ и

фармакологические соединения, обладающие холинотропной направленностью [139; 274; 320].

Принято считать, что рецепторы деятельность которых опосредована через активизацию внутриклеточных мессинджеров, называют метаботропными (metabotropic) рецепторами [53]. Среди AChRs данную функцию выполняют mAChRs (рис. 5) [106; 139].



**Рис. 5.** Принципиальная схема организации метаботропных M-холинорецепторов (mAChRs)

К. Нага и Т. Нага связывают mAChRs с G-белками плазматических мембран клетки, называя и обозначая их как GPCRs [273; 274]. На сегодняшний день mAChRs трактуют как участки аминокислот G-белков плазматической мембраны клеток, принимающих участие в механизме передачи возбуждения, торможения (увеличение, уменьшение) клетки [243; 255; 278; 282; 302].

GPCRs плазматической мембраны клетки находятся в ТМД [153; 154] и погружены на 10–15 Å в липидный слой плазматической мембраны (рис. 6) [232; 284].

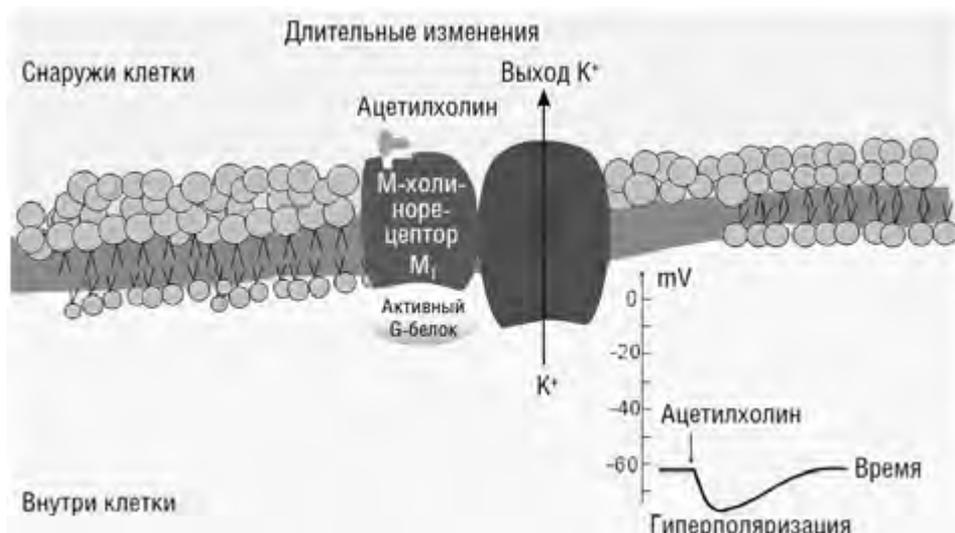


Рис. 6. Схема М-холинорецептора потовой железы

Отмечено, что остатки аминокислот треонина и тирозина, содержащихся в ТМД плазматической мембраны, являются критичными для связывания АХ и АХ-подобных лигандов [278; 501; 502]. На сегодняшний день предложено существование 5 подтипов mAChRs связанных со структурой G-белка плазматических мембран клеток. Их трактуют как M<sub>1</sub>; M<sub>2</sub>; M<sub>3</sub>; M<sub>4</sub>; M<sub>5</sub> [106; 176; 287].

Основываясь на различных ответах mAChRs тканей, все мускариночувствительные рецепторы G-белка плазматической мембраны разделены на группы: 1-ая группа – это подтипы рецепторов M<sub>1</sub>; M<sub>3</sub>; M<sub>5</sub> и 2-ая группа mAChRs рецепторов – это подтипы M<sub>2</sub> и M<sub>4</sub> [273].

Подтипы рецепторов M<sub>1</sub>; M<sub>3</sub>; и M<sub>5</sub> плазматических мембран работают с G<sub>q/11</sub> белками через активацию фосфоинозитола (Фи) механизмов клетки [166; 389], а подтипы M<sub>2</sub> и M<sub>4</sub> mAChRs, работающие с протеиновыми механизмами клеток класса Gi/o, влияют на активность аденилатциклазы клеточной мембраны [397; 495]. Отмечается, что на подтипы M<sub>1</sub>; M<sub>3</sub> и M<sub>5</sub>

mAChRs плазматических мембран, работающих с обменом Фи, оказывает влияние атропин – экспериментально получен факт подавления обмена Фи атропином (рис. 7) [48].

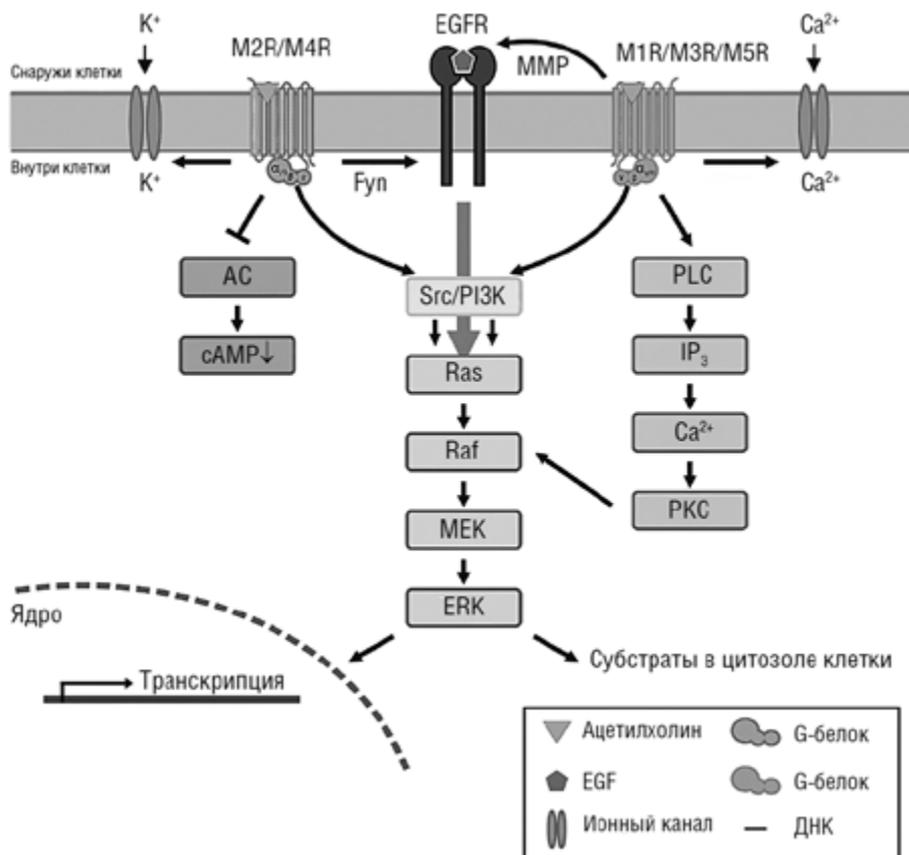


Рис. 7. Схема внутриклеточного сигналинга через разные подтипы М-холинорецепторов

Контакт АХ или мускариночувствительного агониста с mAChRs плазматической мембраны гепатоцитов приводит к активации фосфолипазы С (PLC). Как правило, в механизме сопряжения mAChRs плазматической мембраны с PLC участвует регуляторный белок семейства G<sub>q/11</sub> [223; 235; 438]. PLC под влиянием мускариночувствительного агониста через активацию механизмов связанных с G-белком приводит к гидролизу 4,5-фосфатидилинозитола (Фтд Ин) до 4,5-Ф<sub>2</sub> и в результате ряда преобразований происходит формирование диацилглицерола (ДАГ); Ин-1 и 4,5-Ф<sub>3</sub> [48; 230]. Проявление данных метаболитов трактуется как появление вторичных внутриклеточных посредников (мессинджеров), связанных с активацией G–протеиновых механизмов плазматической мембраны [48; 106].

Необходимо обратить внимание и на такой факт. Образование ДАГ липидной фазы клеточной мембраны обязательно приводит к деацилированию основы фосфолипида ферментом диглицеридлипазой (diglyceride lipase), что способствует образованию свободной ЖК Арахид [288]. Просмотр публикуемых экспериментальных данных свидетельствует, что активация  $m_3$ AChRs увеличивают активность также и фосфолипазы  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) клеточной мембраны [242]. В литературе PLA<sub>2</sub> подаётся, как эффекторный фермент (фермент), передающий сигнал о гидролизе мембранных фосфолипидов, усиливающийся активацией AChRs плазматической мембраны и образующий свободную ЖК Арахид. При этом отмечается связь PLA<sub>2</sub> с G-протеиновыми механизмами плазматических мембран клетки [150].

Отмечено также, что mAChRs увеличивая активность PLA<sub>2</sub>, способствуют увеличению входа и Ca<sup>2+</sup> в гладкомышечные клетки [489].

Отмечены в литературе и такие факты: усиление работы mAChRs плазматической мембраны клетки карбахолом увеличивает сопряжение G-протеиновых механизмов плазматической мембраны и с PLD [305; 327; 397]. Так, усиление активности PLD отмечается при увеличении работы m1AChRs и m<sub>3</sub>AChRs плазматической мембраны, но повышение активности m<sub>2</sub>AChRs и m<sub>4</sub>AChRs в меньшей степени влияют на активность PLD (рис. 8) [436].

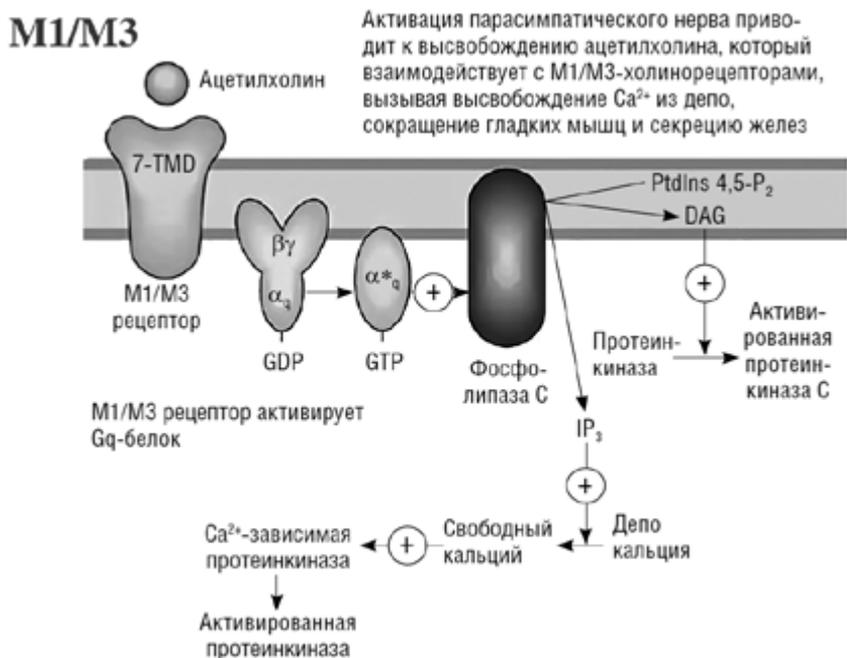


Рис. 8. Схема связанных с M-холинорецептором внутриклеточных событий, опосредуемых фосфолипазой C

Таким образом, работу mAChRs плазматических мембран связывают со структурами G-белков плазматической мембраны клеток. Получены экспериментально данные, свидетельствующие, что холинолитик атропин, реализуя M-холиноблокирующий эффект, работает через G-протеиновый механизм плазматической мембраны клеток [48; 264; 508; 389; 412].

В контексте нашего исследования было отмечено, что атропин (50 мг/кг) способствовал выяснению роли периферических mAChRs индуцированием воспаления, вызванного цитокинами ткани печени животных и сопровождался явлениями окислительного стресса [394].

Атропин (10 мг/кг) совместно с реактиваторами ацетилхолинэстеразы препятствовал развитию окислительного стресса, индуцированного фосфорорганическими соединениями [497], а пилокарпин (M-холиномиметик) способствовал оценке активности цитохромов P450 2A6, 2A13, 2E1 иницированием ПОЛ гепатоцитов [225].

Но данных, связанных с влиянием mAChRs G-белков плазматической мембраны гепатоцитов на формирование процесса ПОЛ периода холодовых нагрузок нами в доступной литературе не найдено.

Для создания полного представления о функциях, строении рецепторов плазматической мембраны работающих с АХ, их влияния на изменение содержания продуктов ПОЛ необходимо сделать акцент и на вопросе о функции, строении AChRs способствующих выполнению ионотропной функции плазматических мембран.

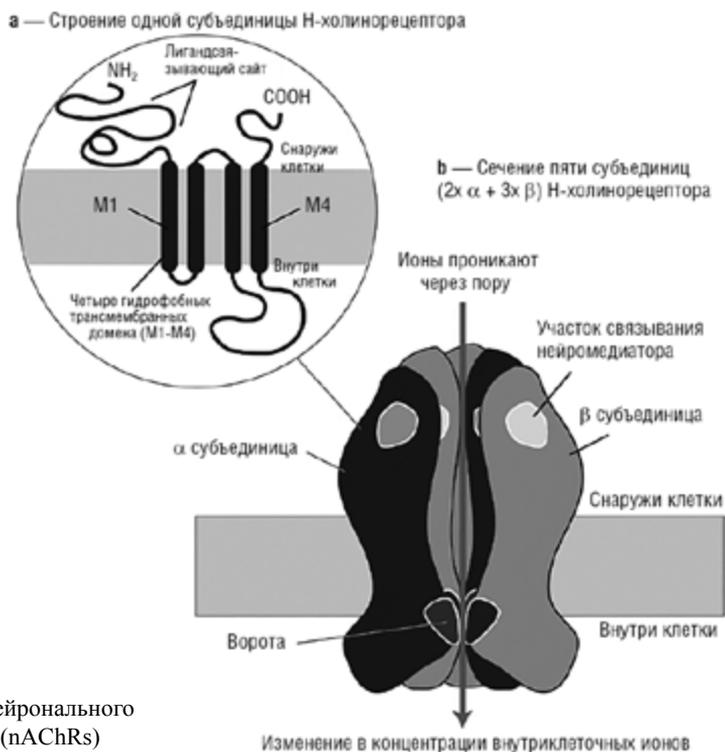
### **1.2.2. Никотиночувствительные ацетилхолиновые рецепторы плазматических мембран. Влияние никотина на содержание малонового диальдегида, ферментов окислительного стресса**

Эффекты, вызываемые АХ в ганглиях вегетативной нервной системы, в мозговом слое надпочечников, в концевых мионевральных пластинках Н.Н. Dale называл никотиноподобным действием и в этих тканях АХ вызывал эффекты сходные с действием малых доз никотина [2; 220].

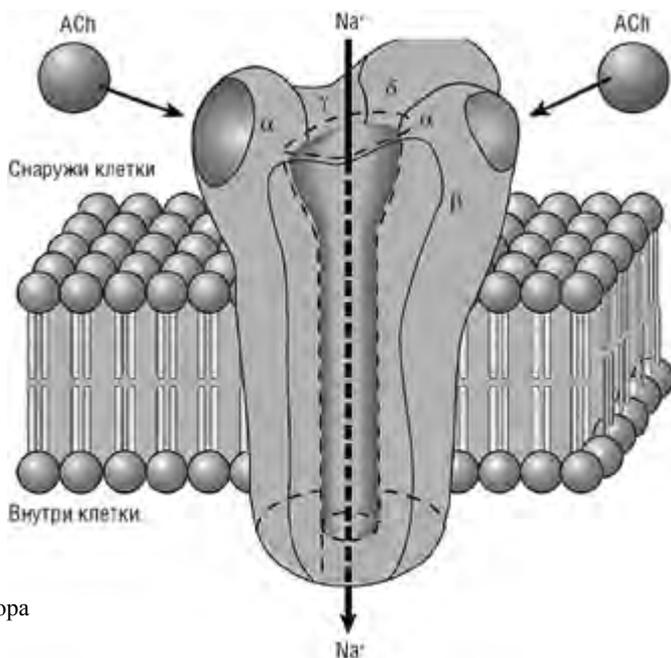
На сегодняшний день nAChRs плазматических мембран клеток отождествляют со структурным трансмембранным протеином, встроенным в плазматическую мембрану, достигающего 250 кДа своей массы и выполняющего ионотропную функцию (рис. 9) [320; 377; 468].

nAChRs представляет собой участки (зоны) мембранного протеина, обеспечивающего работу плазматической мембраны и в зависимости от своего состояния пропускающего преимущественно катионы, в частности ионы натрия и кальция (рис. 10) [377].

Данные литературы показывают факты влияния агониста nAChRs никотина и никотиноподобных соединений на изменение содержания продуктов ПОЛ. Так, в работе S.K. Mahapatra отмечено изменение содержания продуктов ПОЛ присутствием перитонеальных макрофагов инкубационной среды и никотина [337].



**Рис. 9.** Структура нейронального Н-холинорецептора (nAChRs)



**Рис. 10.** Субъединичное строение Н-холинорецептора (nAChRs)

Отмечается, что никотин *in vivo* вызывает изменения активности супероксиддисмутазы (SOD), уменьшает выраженность глутатиона интраперитонеальным введением животным, отмечено влияние никотина и на возникновение окислительного стресса у молодых, взрослых и старых крыс [291].

Авторы считают, что введение никотина в организм животных более выражено индуцирует окислительный стресс у молодых и старых животных [291; 415].

Данное мнение подтверждается и работой Т. Gunnes [271], считающего, что введение никотина (6 мг/кг) в течение 21 дня способствует формированию окислительного стресса. Авторы приводят в доказательство увеличение содержания МДА крови. Это же мнение поддерживается и работой В.А. Halima [275], показавшего, что никотин способствует увеличению содержания МДА молока животных на фоне снижения активности ферментов антиоксидантной системы – SOD и каталазы. На фоне развивающегося окислительного стресса отмечается повышение токсичности вводимого животным никотина [303; 415]. Но данных влияния холодовых нагрузок на деятельность nAChRs ионных каналов плазматической мембраны гепатоцитов в формировании ПОЛ печени нами в доступной литературе не отмечено.

Так, как классическим агонистом nAChRs ионных каналов гепатоцитов является никотин, то рассмотрению вопроса содержания никотина листьев табака, трансформации никотина в структуры, позволяющие изменять содержание продуктов ПОЛ биологической системы и будет посвящён следующий раздел литературного обзора.

### *1.2.2.1. Окислительные соединения листьев табака, окислительные метаболиты никотина в организме животных*

Никотин находится в листьях табачных растений и считают, что из всех алкалоидов листьев табака содержание никотина составляет 95% [164; 320; 441]. Типичным представителем никотина является оптический изомер никотина – левовращающий изомер (S-изомер), а правовращающий изомер никотина (R-изомер), по данным литературы, определяется до 10% и только в табачном дыму [441; 405; 460].

Важным метаболитом алкалоида никотина, поступающего в ткань печени человека, является лактамное производное никотина – котинин (cotinine). В ткани печени до 70-80% никотина трансформируется в эту структуру [163]. Подобная трансформация включает два пути. Первый путь – обработка никотина в системе цитохрома P450 2A6 эндоплазматического ретикулума гепатоцитов с формированием никотин- $\Delta 1',5'$ -иминиум иона [164; 368]. И второй шаг в окислительной трансформации никотина – это превращение никотин- $\Delta 1',5'$ -иминиум иона в котинин с помощью цитоплазматической альдегидоксидазы [182; 261].

В контексте наших исследований трансформация никотина ткани печени через активацию цитохрома Р-450 и создания никотин- $\Delta 1',5'$ -иминиум иона, имеющего в структуре атома азота пирролидинового кольца переменную валентность, возможно, становится дополнительным источником активации одноэлектронного окисления, восстановления липидов печени.

Другим метаболитом никотина в ткани печени и представляющего интерес в наших исследованиях является формирование никотин-1'-N-оксида. Принято считать, что только 4% никотина из всего поступившего объёма метаболизируются по этому пути [165; 454].

Превращение никотина в никотин-1'-N-оксид происходит в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов и включает флавопротеиновую ферментную систему с участием FMO, формирующих при этом два возможных диастомера никотин-1'-N-оксида: это 1'(R)-2(S)-cis никотин-N'-оксид и 1'(S)-2(S)-trans никотин-N'-оксид. Следует отметить, что trans-изомер никотин-1'-N-оксида – это достаточно специфичный метаболит человеческого организма [201].

Формирование изомеров никотин-1'-N-оксида, как и самого никотин-1'-N-оксида, сопровождается появлением при пирролидиновом кольце изомерно расположенного альдегидного кислорода, способного принимать участие в ПОЛ. Свидетельством тому является получение факта, что в толстом кишечнике человека с участием бактериальной флоры из cis- и trans-изомеров никотин-1'-N-оксида происходит восстановление никотин-1'-N-оксида с последующей рециклизацией этой структуры и превращением в никотин [218; 219].

В дополнении к окислению пирролидинового кольца никотина кислородом происходит и метилирование атома азота пиридинового кольца никотина, что приводит к созданию никотин изометониум иона.

Из метаболитов котинина, возникающих первично в ткани печени, для наших исследований возможный интерес в индуцировании ПОЛ представляют котинин-N-оксид [218], котинин метониум ион [350] и котинин глюкуронид [215].

При анализе метаболитов минорных компонентов алкалоидов табака внимание как возможного источника формирования продуктов ПОЛ печени привлекли следующие метаболиты – это производные норникотина – норникотин- $\Delta 1'(2')$ -нитрон [144], производные анабазина – N-метиланабазин-N'-оксид [162] и производные  $\beta$ -никотирина –  $\beta$ -никотерин эпоксид [453].

Таким образом, анализ доступной литературы позволяет нам выделить из числа соединений, содержащихся в листьях табака и метаболитов никотина, формирующихся в ткани печени структуры, способные индуцировать ПОЛ печени при введении экспериментальным животным никотина, полученного из экстракта листьев табака.

*1.2.2.2. Липидно-белковые связи (аддукты Михаэлиса, основания Шиффа) и агонисты холинергических структур плазматических мембран*

Литература, освещающая работу AChRs плазматических мембран клеток, показывает, что окислительные изменения в липидах плазматической мембраны способны влиять на пространственную конформацию аминокислот, встроенных в липидную фазу плазматической мембраны, и, соответственно, на работу AChRs [248; 266; 290; 306; 362; 420; 480; 481].

Как правило, усиление ПОЛ в плазматических мембранах клетки сопровождается формированием связей между липидами, имеющими альдегидный кислород (это, как правило, ненасыщенные липиды с карбонильными группами в  $\alpha$ - и  $\beta$ -положении алифатической цепочки ЖК), обладающих свойством электрофильности [249; 290] с нуклеофильными группами  $\text{NH}_2$ , SH-остатков аминокислот цистеина, лизина и находящимися в липидной фазе мембран клеток [266; 267].

Результатом контакта липидов, несущих альдегидный кислород, и нуклеофильными группами  $\text{NH}_2$ , SH-остатков аминокислот цистеина, лизина является формирование иминовых оснований Шиффа, аддуктов Михаэлиса [178; 192; 280; 290; 333; 336; 343; 420; 470].

Основания Шиффа в свою очередь способны давать вторичные реакции с липидами плазматических мембран, образуя пиррольные соединения, лактамы и гидролактамы. Эти структуры образуют уже стабильные протеин – липидные связи и способны определяться *in vivo*, способствуя дальнейшей полимеризации протеинов, лишив их выполняемой ими функций [480; 505]. Так, по данным литературы, на примере ткани миокарда показывается образования связи PL-isolevuglandin protein и повреждение функции  $\text{K}^+$ -канала кардиомиоцитов [179].

Считают, что и введение с табачным дымом в ткань лёгкого никотина приводит к точечным мутациям ДНК в генетическом аппарате эпителиальных клеток лёгких и, как результат, образования липидно-белковых аддуктов [341].

Отмечен факт, что индуцирование ПОЛ неферментативными (аскорбат-зависимыми) механизмами в присутствии нервных терминалей церебральной коры животных ингибирует  $\text{K}^+$ -зависимое освобождение АХ [355].

Индуцируемое повышение содержания ЖК Арахиса в церебральных синапсосах коры мозга ингибирует повышение холина и снижает содержание АХ ткани мозга [171].

В подборе сообщений проводится связь между формированием липидно-белковых связей и нарушениями функций в тканях, связанных с работой холинергических структур плазматических мембран, но отмечают и сообщения, свидетельствующие, что искусственно созданное повышение содержания АХ ткани мозга у развивающихся (6-дневных) крысят, созданное введением ингибиторов AChE, уменьшает уровень МДА, уменьшая при этом пул окисленного глутатиона [456].

В литературе отмечается и такой факт, что  $\alpha$ - и  $\beta$ -ненасыщенные альдегиды липидов могут вступать в контакт со свободными тиоловыми группами глутатиона – одного из ярких представителей антиокислительной системы [239].

Таким образом,  $\alpha$ - и  $\beta$ -ненасыщенные карбонильные группы в липидных структурах клетки способны реагировать как с  $\text{NH}_2$  и  $\text{SH}$ -группами остатков аминокислот, входящими в состав AChRs плазматических мембран клетки, образуя не только основания Шиффа, аддукты Михаэлиса, но и способны вступать в связь с тиоловыми группами глутатиона, представляющего антиоксидантную систему клетки.

Поэтому материал введения, данные литературы по влиянию АХ, никотина, холинергических агонистов на содержание продуктов ПОЛ, данные по способности липидов клеточных мембран вступать в связь с аминокислотными структурами белков плазматических мембран заставляет нас изложить результаты, посвящённые влиянию накопленного эндогенного АХ в тканях, введению животным прямого М-холиномиметика пилокарпина на содержание продуктов ПОЛ крови, миокарда, лёгких периода 14 дней холодной нагрузки, оценить реципрокность при определении индекса деформации эритроцитов на фоне пилокарпина и атропина периода формирования холодной адаптации у животных.

### **1.3. Влияние непрямого М,Н-холиномиметика неостигмина, прямого М-холиномиметика пилокарпина на содержание продуктов перекисного (свободно-радикального) окисления липидов крови, ткани лёгкого, миокарда животных периода 14 дней охлаждения. Индекс деформации эритроцитов периода формирования холодной адаптации и введении животным пилокарпина, атропина**

Данные литературы по этому вопросу свидетельствуют, что в крови на 3-й день охлаждения животных и в/бр введения неостигмина (0,5 мг/кг) отмечается увеличение содержания диеновых конъюгатов общих липидов (ДК ОЛ), ГП ОЛ и МДА крови. В ткани лёгкого при введении животным неостигмина на 6-й день охлаждения животных отмечается повышение содержания ГП ОЛ, при сниженном содержании ДК ОЛ лёгкого и МДА ткани лёгкого [116].

Данные, связанные с введением животным прямого М-холиномиметика пилокарпина на фоне охлаждения показывают, что на 6-й день холодной нагрузки и введения пилокарпина (10 мг/кг) отмечали увеличение содержания ДК ОЛ крови, снижение содержания ГП ОЛ крови и только к 15-му дню действия холода и введения на этом фоне пилокарпина отмечался рост ГП

ОЛ крови. Увеличение содержания МДА в крови регистрировали на протяжении только 8 дней.

В легочной ткани применение прямого М-холиномиметика пилокарпина увеличивало содержание ДК ОЛ и ГП ОЛ в течение 3 дней охлаждения животных, с последующим снижением данных показателей на протяжении всего периода охлаждения.

Во все дни холодовой нагрузки величина МДА, определяемого в гомогенате лёгкого опытной группы животных, была снижена в сравнении с животными, подвергавшимися действию только холода.

Возбуждение периферических mAChRs пилокарпином и определение содержания продуктов ПОЛ гомогената миокарда показывало снижение ДК ОЛ, но в то же время отмечали увеличение ГП ОЛ и МДА, определяемых в гомогенате миокарда на 1, 3, 6, 8 и 15-й дни холодовой нагрузки [116].

Сопоставляя полученные результаты, были сделаны следующие выводы. Непрямой М,Н-холиномиметик неостигмин (0,5 мг/кг) и прямой М-холиномиметик пилокарпин (10 мг/кг) влияют на содержание продуктов ПОЛ в период 14 дней холодовой нагрузки, создаваемой экспериментальным животным.

Эффекты по изменению содержания продуктов ПОЛ, возникающих при введении фармакологического агента неостигмина, по своей направленности совпадают с эффектами прямого М-холиномиметика пилокарпина.

В гомогенате лёгкого сходные по направлению эффекты между препаратом неостигмином и прямым М-холиномиметиком пилокарпином отмечаются при определении ДК ОЛ, ТБК-активного продукта – МДА гомогената печени в первые 3 дня действия холода.

Иллюстрируя сохранение функций в периферических mAChRs на фоне длительного холода, можно отметить, что введение фармакологических агентов, возбуждающих и блокирующих mAChRs (пилокарпин, атропин), вызывает противоположные по направлению эффекты при определении индекса деформации эритроцитов – возбуждение mAChRs (пилокарпин 10 мг/кг) увеличивает степень деформации эритроцитов, а блокада mAChRs в эритроцитах (атропин 1 мг/кг) уменьшает способность к деформации у эритроцитов на протяжении 14 дней охлаждения [475], при этом следует отметить, что у животных подвергавшихся формированию холодовой адаптации, отмечается накопление продуктов ПОЛ в эритроцитах крови [15; 173].

Полученные выводы дают основание для высказывания предположения о возможном влиянии холинетропных средств на формирование продуктов ПОЛ и в печени животных периода холодовых нагрузок через влияние на периферические mAChRs и nAChRs плазматических мембран клеток, но для понимания обсуждаемого вопроса необходимо изложение данных литературы, связанных с процессом формирования ПОЛ.

## 1.4. Формирование продуктов перекисного (свободно-радикального) окисления липидов в тканевой среде

А.И. Арчаков и Ю.А. Владимиров, опираясь на работы Р. Hochstein и L. Ernster, предлагают связывать окислительные системы мембран эндоплазматического ретикулаума гепатоцитов (МЭРГ) с процессом ПОЛ [7; 24] в ферментных системах МЭРГ, использующих в качестве донора редуцирующих эквивалентов восстановленный  $\text{NADP} \cdot \text{H}$ , применяемый *in vitro*. При неферментативном активировании СРО ненасыщенных жирнокислотных компонентов липидов, подходящую для акцептирования redox-потенциалов редуцирующих эквивалентов, – аскорбиновую кислоту [7].

Безусловно, формирование ПОЛ при различных видах стресса, происходящее в биологических тканях, как правило, связано с одноэлектронным окислением (отдача электронного, водородного потенциала), восстановлением (присоединение электронного, водородного потенциала) аллильно и бис-аллильно расположенных метиленовых групп ненасыщенных компонентов липидов [11; 24; 133; 241].

Присутствие двойной связи на участке алифатической углеводородной цепи (на примере средне- и длинноцепочечных ЖК) способно предопределять смещение электронной плотности орбиталей атома углерода метиленовой группы к атому углерода, находящемуся в  $\alpha$ -положении по отношению к двойной связи алифатической углеводородной цепи ЖК [241].

В ненасыщенных компонентах липидов это создаёт предрасположенность к возникновению феномена неспаренной валентности и в этом плане активно формируют неспаренную валентность дивинилметановые структуры PUFA с 2, 3, 4 и более количеством двойных связей [50; 407].

Изоленовый тип расположения метиленовой группы в дивинилметановых структурах жирнокислотной алифатической цепи сопровождается уменьшением плотности электронных орбиталей на углероде метиленовой группы, и это явление приводит к уменьшению энергии, затрачиваемой для удаления атома водорода от углерода метиленовой группы [50].

Так, по данным Ю.А. Владимирова и А.И. Арчакова, энергия разрыва  $\text{C} - \text{H}$  связи в окисляющихся соединениях, таких как насыщенные ЖК ( $\text{C}_{16:0}$  – пальмитиновая,  $\text{C}_{18:0}$  – стеариновая) составляет 93 ккал/моль. Энергия разрыва связи  $\text{C} - \text{H}$  атома углерода с одной двойной связью у ЖК семейства  $\omega$ -9 ( $\Delta^9 \text{C}_{18:1}$  – олеиновая, моноеновая ЖК) составляет 89 ккал/моль, а энергия, затрачиваемая для удаления атома водорода от углерода, находящегося в  $\alpha$ -положении по отношению к двойной связи при аллильном расположении метиленовой группы, составляет 77 ккал/моль [24; 50; 256]. Таких возможных мест удаления атома водорода от углеродов метиленовых групп ЖК, на примере ЖК Арахиса, отмечается до 5. Удаление атома водорода метиленовой группы сопровождается образованием не-

спаренной (свободной) валентности у углерода метиленовой группы [160; 411], обозначаемой, по данным литературы, и как углерод-центрированный радикал [414].

Как правило, неспаренная валентность атома углерода остатка метиленовой группы алифатической цепи ЖК приравнивается к появлению  $\pi$ -электрона в системе сопряжённых двойных связей. Энергия  $\pi$ -электрона углерода остатка метиленовой группы не отличается от энергии  $\pi$ -электронов двух соседних атомов углерода системы двойной связи, и возникающая неспаренная валентность данного участка молекулы ЖК создаёт энергетическую нестабильность, что в присутствии триплетной формы кислорода (ТФК) биологической среды (а особенно, при изменении концентраций ТФК) может привести к делокализации двойной связи [24].

Необходимым условием для делокализации двойной связи данного участка ЖК должно быть присутствие ТФК с определённым парциальным давлением в тканях [68; 276].

Соприкосновение ТФК с фрагментом ЖК имеющей углерод-центрированный радикал определяется не только диффузией и парциальным давлением ТФК данного участка и находящейся ЖК [442], но и с количественным, качественным (trans-изомеры ЖК) изменением содержания PUFAc липидов тканей [294; 406; 407]. Важно отметить, что углерод-центрированные радикалы ЖК могут иметь R- и S-конфигурацию расположения кислорода по отношению к углероду [410]. Участок ЖК с делокализованной двойной связью при дальнейшем контакте с ТФК тканевой среды приводит к формированию перокси радикала [407; 411], существование которого по длительности определяется от миллисекунд до секунды [344].

#### **1.4.1. Первичные продукты перекисного (свободно-радикального) окисления липидов и активация неферментативных механизмов окисления. Циклические структуры в продуктах перекисного окисления липидов**

Вслед за этапом делокализации двойной связи ЖК происходит перегруппировка двойных связей алифатической цепочки ЖК [24; 407], и на месте делокализованной двойной связи формируется участок ДК с кислородом в виде перокси радикала [338]. Кислород перокси радикала, обладая высокой реакционной способностью, вступает в связь практически с любым атомом водорода, особенно в присутствии металлов Fe, Cu, способствуя образованию гидроперекисной группы ЖК (считают, что этот механизм лежит в основе, как правило неферментативного типа окисления липидов) [338]. Источником водорода для формирования гидроперекисной структуры ЖК в присутствии перокси-радикала обычно становится водород, донатируемый с близлежащего жирнокислотного ацила или водород гидроксила  $\alpha$ -токоферола [50; 371; 483; 498].

При неферментативном характере окисления липидов происходит изменение положения двойных связей алифатической цепи ЖК – переход из *cis*-, в *trans*-изомеры ЖК, отмечается повышение содержания *trans-trans* конъюгированных диенов ЖК с последующим их преобразованием в *trans-trans* гидропероксиды ЖК [406; 407].

Отсутствие донатирования  $H^+$  (водорода) в момент образования перокси-радикала ЖК способно вызывать циклизацию алифатической цепочки ЖК (формирование 5-членного простанового кольца), что приводит, в дальнейшем, к формированию циклических эндопероксидов [407; 408; 478].

Формирование циклических эндопероксидов происходит, как правило, при одноэлектронном окислении PUFAs, с тремя и более количеством двойных связей [208; 387; 424; 425; 442].

При достаточно высоком парциальном давлении (напряжении) кислорода тканей происходит трансформация циклических эндопероксидов в изофураны (IsoFs) [244; 398; 425]. Считают, что рост содержания IsoFs пропорционален экспоненте напряжения кислорода тканевой среды [425].

Уменьшение парциального напряжения (концентрации) ТФК тканевой среды приводит к трансформации циклических эндопероксидов в изопростаны (IsoPs), а дальнейшее донатирование  $H^+$   $\alpha$ -токоферолом, жирнокислотным ацилом формирует в IsoPs гидроперекисные группы [187].

В формировании циклических эндопероксидов возможны варианты – присоединение молекул ТФК с донатированием  $H^+$  приводит к образованию гидропероксидов–эпидиоксидов, создавая тем самым условия для дальнейшего  $\beta$ -расщепления ( $\beta$ -scission) моноциклического эндопероксида с эпидиоксид-радикалом и превращением в дальнейшем этих структур в альдегиды, альдегидные кислоты [168; 240; 408].

В конечном итоге результатом окислительного расщепления PUFAs в липидах становится образование реактивных короткоцепочечных, длинноцепочечных и циклических альдегидов [234; 239; 280; 333; 363; 425; 464].

#### **1.4.2. Альдегиды липидов мембран при активации перекисного (свободно-радикального) окисления. Влияние холинотропных средств на содержание альдегидных продуктов окисления липидов**

Из формирующихся короткоцепочечных  $\alpha$  и  $\beta$ -ненасыщенных альдегидов, как результата ПОЛ, наиболее широко в доступной литературе представлены данные об акролеине (acrolein) [192; 336; 363; 464], глиоксале (glyoxal) и МДА [362; 480; 481].

##### *1.4.2.1. Акролеин (пропеналь, *oxo-diene*), глиоксаль*

Принято считать, что акролеин и глиоксаль – это двухуглеродные остатки окислительного  $\beta$ -расщепления алифатической жирнокислотной цепи,

содержащий альдегидный кислород с количеством ненасыщенных связей не менее двух [236; 239; 249; 464]. Из всей суммы  $\alpha$  и  $\beta$ -ненасыщенных альдегидов, считают, что акролеин один из сильнейших электрофилов, в 100-150 раз активней вступающий в связь с тиоловыми группами, в том числе и с остатками аминокислоты цистеин [236].

Потенциальной мишенью для акролеина, как правило, являются боковые цепи остатка аминокислот цистеина, гистидина, лизина и N-терминали аминокислот остатков других аминокислот [192; 266; 336]. С этими фактами, например, связана потеря активности многих ферментов, таких как альдо-редуктазы, протеинтирозин фосфатазы [446; 463]. Считают, что существует связь с окислительной токсичностью акролеина и способностью акролеина истощать пул глутатиона [309; 464]. В эксперименте *in vitro* показано, что акролеин способен формировать с остатками аминокислоты гистидина комплекс акролеин–гистидин, в свою очередь формирующего аддукты с протеинами [336].

Отмечено, что повышение концентрации акролеина плазмы крови человека регистрируется не только при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) [363], но и при других видах патологии, сопровождающихся формированием ПОЛ [376; 384; 434; 464; 482]. Но и данные литературы свидетельствуют, что активация ПОЛ не может быть большим источником акролеина в тканях и его измерение используется как маркёр загрязнения окружающей среды, в частности сигаретного дыма [165; 464].

#### *1.4.2.2. Малоновый диальдегид*

Малоновый диальдегид (МДА) – трёхуглеродный остаток окисления ЖК, содержащий два альдегидных кислорода, используется как маркёр пероксидации ЖК семейства  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 ЖК биологической ткани [227; 239; 270; 376].

При нейтральной pH МДА представляет собой енолатный анион с низкой реактивностью [239], и МДА способен взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами [343; 435]. МДА *in vivo* реагирует с первичными аминами остатка аминокислот, формируя NE (2-propenal)–lysine (так называемый перекрещиваемый тип соединения – мост) между остатками аминокислот лизин – лизин в протеинах [280; 290; 482], и этот тип соединений между остатками аминокислот, как результат ПОЛ, определяется в липопротеидах низкой плотности (LDL) и фракции ApoB сыворотки крови [395]. Было отмечено, что и гликирование протеинов увеличивает их сродство к МДА [362]. Поэтому, одновременное присутствие МДА и ацето–альдегидных формирований в остатках аминокислот приводит к формированию аддуктов Михаэлиса [333; 336], что в свою очередь приводит в дальнейшем к провоспалительным, профиброзным эффектам ткани печени и способно индуцировать сильный иммунный ответ [480].

#### 1.4.2.3. 4-Гидроксиалкены (4-hydroxyalkenals)

Из длинноцепочечных альдегидов при активации ПОЛ широко представлены 4-гидроксиалкены: 4-HNE, 4-ONE, 4-HNE, 4-ONE, находящиеся или в составе OxPLs мембран клетки, или в свободном состоянии цитозоля клетки [170; 484]. Считают, что ферментативная пероксидация PUFAs семейства  $\omega$ -6 приводит, как правило, к генерации следующих 4-гидроксиалкенов: 4-HNE и 4-HDDE [270], а неферментативное окисление PUFAs семейства  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 определяют формирование 4-гидроксиалкенов: 4-HNE и 4-HNE – достаточно подвижных кетоальдегидов, обладающих и свойством летучести [170; 443].

Сопоставляя данные по длинноцепочечным 4-гидроксиалкенам, можно отметить, что 4-HNE наиболее ярко представлен в жировой ткани и ткани печени [280; 332; 485]. Распространённым мнением является и то, что 4-HNE вызывает токсичность при многих заболеваниях, в патогенез которых вовлечена окислительная модификация протеинов и нуклеиновых кислот в клетках, как результат образования ковалентных связей 4-HNE с  $\text{NH}_2$  группами в остатках аминокислот [234].

Считают, что 4-HNE – производное окислительной модификации гидроперекиси PUFAs из семейства ЖК  $\omega$ -6 (ЖК Арахиса) [234; 270; 332], формирующего промежуточный продукт 4HP2HNE и трактуемого как перокси-радикал [443]. 4-HNE образуется и в результате липидной пероксидации PUFAs  $\omega$ -3 (ЖК Эйкоза) в сетчатке глаза, ткани ЦНС, включая спинной мозг. 4-HNE способен образовывать ковалентные связи и с остатками аминокислот лизина, гистидина, цистеина, формируя аддукты Михаэлиса, Шиффовы основания [290], вызывая при этом токсические эффекты в клетке [280; 452]. Хотя на этот счёт есть и другие сведения: отмечают, что 4-гидроксиалкены (4-HNE) вовлечены в регулирование роста, пролиферации и дифференциации клеток [234] и, по всей видимости, в этом вопросе в работу с 4-HNE вовлечена и антиоксидантная система клетки в виде глутатиона [485].

#### 1.4.2.4. Изопропановая часть пути формирования циклических альдегидов

Как уже отмечалось, увеличение парциального напряжения ТФК тканевой среды сопровождается формированием в липидах тканей циклических эндопероксидов изофуранового ряда (IsoFs) [244; 398; 425]. При недостаточном содержании кислорода отмечают рост и другого вида циклических эндопероксидов – изопропанов (IsoPs) с обязательным участием в этом процессе ЖК Арахиса [160; 424]. Как результат дальнейшего расщепления циклопентанового кольца IsoPs у циклических эндопероксидов [358; 387] формируются альдегиды циклической структуры – изолевугландины (isolevuglandins) [433; 434], или изокетали (IsoKs), имеющие в своей основе полуацетальное кольцо [178; 179]. Перечисленные циклические альдегиды так же, как и при формировании короткоцепочечных, длинноцепочечных

альдегидов, проходят этап формирования ДК, ГП и изменение их содержания в тканях при введении агонистов или антагонистов холинергического звена в доступной нам литературе не отмечено.

### 1.4.3. Продукты перекисного (свободно-радикального) окисления липидов и ферментативные механизмы окисления липидов

#### 1.4.3.1. Продукты перекисного (свободно-радикального) окисления липидов при активации циклооксигеназ (простагландин-синтазы), связь с механизмами GPCRs плазматической мембраны клетки

Изменения содержания продуктов ПОЛ возникают и в результате работы ферментативных механизмов окисления липидов, их связывают, как правило, с работой циклооксигеназ (COX) – COX<sub>1</sub> и COX<sub>2</sub>. Идентичность в строении ферментов COX<sub>1</sub> и COX<sub>2</sub>, по данным литературы, достигает 60% [459]. Считают, что пероксидазная часть каталитического домена фермента COX<sub>2</sub> содержит протопорфирин IX, способный переходить из состояния гема (Fe<sup>2+</sup>) в состояние гемина (Fe<sup>3+</sup>) [346]. В просвете канала фермента COX<sub>2</sub> отмечают присутствие критических точек окисления липидов – остатков аминокислот аргинина, серина, тирозина, гистидина [198; 212].

Принято считать, что субстратным обеспечением ферментной активности COX<sub>2</sub> является ЖК Арахид. При движении и поворотах ЖК Арахид в канале фермента COX<sub>2</sub> 13-й углеродный атом (при этом углеродном атоме отмечается положение одного из бис-аллильно расположенных метильных групп ЖК Арахид) оказывается в непосредственной близости к остатку ароматической аминокислоты тирозина [198; 428; 459], и геминная форма протопорфирина IX (Fe<sup>3+</sup>), забирая электронный потенциал атома водорода с фенольного гидроксила аминокислоты тирозина, способствует образованию тирозильного радикала в просвете канала [486].

Удаление атома H<sup>+</sup>, находящегося в рго-S положении тирозильного радикала от субстрата окисления ЖК Арахид, и обеспечивает начало ферментативного окисления липидов [198].

Считают, что в формировании тирозильного радикала большую роль играет явление, связанное с феноменом PCET [159; 388]. При этом высказываются мнения, что и последующие шаги в окислительной трансформации ЖК Арахид напоминают механизм неферментативного ПОЛ, но уже в структуре аминокислот [268].

Обработка ферментами COX1 ЖК семейства C<sub>20</sub> сопровождается образованием PG<sub>s1</sub>, а в случае контакта ЖК семейства C<sub>20</sub> с ферментом COX<sub>2</sub> – формирование PG<sub>s2</sub> [198; 342; 427]. Отмечают, что PG<sub>s1</sub> организуют функцию сохранения гомеостаза внутренних органов. Так, нахождение в интерстициальных и мезотелиальных клетках стенки желудка определяет регулирование желудочной цитопротекции [269]; присутствие в гладкой мускулатуре

кровеносных сосудов и тромбоцитов  $PG_{s1}$  определяет состояние агрегационного и коагуляционного гемостаза [198].

$COX_2$ , локализуясь в клетках паренхимы мозга, почек, печени, способствуя возникновению  $PG_{s2}$ , играет важную роль в формировании воспаления [347], опухолеобразования тканей [326; 367; 423].

Результаты экспериментов свидетельствуют, что ферменты  $COX_1$  и  $COX_2$  (соответственно и продукты деятельности ферментов  $COX_1$  и  $COX_2 - PG_{s1}$  и  $PG_{s2}$ ), несмотря на сходство в строении, не способны к обмену принадлежащим им функций [318; 506]. Фермент  $COX_2$  имеет и другое обозначение в литературе – простагландин-синтаза (синтаза), находящаяся либо в плазматической мембране клетки –  $mPG_{s2}$ , либо в цитозоле клетки –  $cPG_{s2}$  [380]. По данным литературы, ферментативная оксигенации ЖК Арахидоновой кислоты простагландин-Н синтазой ( $PGH$ -synthase) формирует нестабильный промежуточный эндопероксид  $PGH_2$  [366]. Считают, что  $PGH$ -синтаза не оксигенирует PUFAs, эстерифицированные к фосфолипидам или триглицеридам [330]. Повышенная активность  $PGH$ -синтазы приводит к увеличению синтеза биологически активных эндопероксидов в цитозоле клетки –  $PGE_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGF_{26}$ ,  $PGI_2$ ,  $TXA_2$ ,  $TXB_2$ , имеющих место также и в мембранных фракциях эндоплазматического ретикула гепатоцитов [342].

Существуют данные, свидетельствующие, что в создании эндопероксида  $PGH_2$  активно принимают участие механизмы, связанные с GPCRs плазматической мембраны клетки [281; 282]. Отмечено, что из формирующихся биологически активных эндопероксидов увеличение содержания  $PGF_{26}$  приводит к бронхоспазму и к освобождению АХ в ткани печени [331].

Эндопероксиды  $TXA_2$  и  $TXB_2$  рассматривают также как индукторы агрегации тромбоцитов и усилители спазма гладкой мускулатуры [331].

Циклические эндопероксиды ( $PGE_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGF_{26}$ ,  $PGI_2$ ,  $TXA_2$ ,  $TXB_2$ ) способны из цитозоля клетки диффундировать (проникать) через плазматическую мембрану клетки и на поверхности мембраны связываться не только с простагландиновыми (простановыми) рецепторами (EP; DP; FP; IP; TP) [380], но и с GPCRs плазматической мембраны клетки [175]. При формировании вышеперечисленных циклических эндопероксидов характерен этап формирования ДК и ГП.

Необходимо отметить, что вопросы изучения влияния фармакологических агентов, работающих через холинергические структуры плазматической мембраны гепатоцитов и влияющих на содержание продуктов ПОЛ с участием  $COX$ , простагландин-синтаз в периоды 3-часового и 5-дневного охлаждения животных, нами в доступной литературе не найдены, но данные литературы отмечают прохождение этапа формирования ДК, ГП при формировании простаноидов и способность циклических эндопероксидов (простаноидов) ( $PGE_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGF_{26}$ ,  $PGI_2$ ,  $TXA_2$ ,  $TXB_2$ ) связываться с GPCRs механизмами плазматической мембраны клетки.

### 1.4.3.2. Продукты перекисного (свободно-радикального) окисления липидов при активации липооксигеназ (участие протеинкиназы C, фосфатидилинозитол-3-киназы)

Обобщая данные литературы, представленные ранее, можно подчеркнуть, что характерной чертой ферментативного ПОЛ, осуществляемого через СОХ, простагландинсинтетаз с участием ЖК семейства  $C_{20}$  является циклизация, формирование простанового кольца и, как результат, создание циклических эндопероксидов.

Программа же окисления ЖК семейства  $C_{20}$ , реализуемая с вовлечением липооксигеназы (LOX), предусматривает введение двух атомов кислорода в алифатическую цепь ЖК семейства  $C_{20}$  без феномена циклизации с формированием промежуточных продуктов ПОЛ, таких как НрЕТЕ с образовавшейся гидроперекисной группой и НЕТЕ [183; 237; 390].

LOX – негемовый, Fe-содержащий фермент, выполняющий функцию диоксигеназ [289]. В номенклатуре LOX млекопитающих данный фермент связывает с оксигенацией ЖК Арахидоновой кислоты. Классифицируют LOX в соответствии с позиционной спецификой и оксигенацией PUFAs – это 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX, 15-LOX [289; 325].

В своей структуре LOX обязательно содержит субстрат-связывающее углубление – условие, необходимое для контакта PUFAs с негемовым Fe [237]. Субстрат-связывающий карман LOX выстлан гидрофобными аминокислотами, что позволяет принимать PUFAs от липидов мембран клетки. В основе связывания данного участка LOX и субстрата окисления лежит возникновение  $\pi$ -электронных и ионных связей [487].

В механизме оксигенации ЖК Арахидоновой кислоты ферментом LOX отмечают ряд последовательных реакций – это избирательное удаление атома H от бис-аллильно расположенной метиленовой группы алифатической цепочки ЖК с возникновением феномена РСЕТ [216; 289]. Так, негемовое  $Fe^{3+}$  каталитического участка фермента LOX забирает электрон с атома H остатка метиленовой группы, а оставшийся протон  $H^+$  уходит с данного участка PUFAs на донаторование перокси-радикала ЖК [216; 254].

Результатом активации LOX по месту расположения углерода  $C_{13}$  (бис-аллильно расположенная метиленовая группа ЖК Арахидоновой кислоты) в субстрате окисления ЖК формируется перокси-радикал  $15S-HpETE$ , в случае перегруппировки углерод-центрированного радикала +2. При перегруппировке углерод-центрированного радикала-2 образуется перокси-радикал  $11R-HpETE$  с дальнейшей трансформацией его в  $15-HEPE$  и  $11-HEPE$  [315; 301; 487]. Через феномен делокализации двойной связи, в присутствии ТФК и перегруппировкой углерод-центрированного радикала происходит не только оксигенация ЖК Арахидоновой кислоты, связанная с вводом молекулы кислорода в плоскость двойных связей у аллильно или бис-аллильно расположенной метиленовой группы, но и формирование ДК [311]. С активностью LOX определён антагафациальный тип ввода кислорода в пентадиеновый мотив

ЖК Арахидной кислоты; энергетический барьер при формировании перокси-радикала в присутствии ГФК незначителен и поэтому, достаточно легко происходит формирование НрЕТЕ [289]. В организме человека отмечают работу LOX, присоединяющих кислород к углерод-центрированному радикалу в конфигурациях 5R и 5S; 8R и 8S; 11R и 9S; 12R и 12S, и 15R [258; 444].

Таким образом, в результате ферментативной оксигенации ЖК Арахидной кислоты LOX через НрЕТЕ с образованием ДК, как промежуточного продукта, формируются окислительные изомеры НЕТЕ: 5-НЕТЕ, 8-НЕТЕ, 9-НЕТЕ, 11-НЕТЕ, 12-НЕТЕ и 15-НЕТЕ [211; 444]. Все они вызывают разные биологические эффекты. Так, изомер 12(S)-НЕТЕ увеличивает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток сосудов [381; 471], индуцируется активность РКС с ретракцией эндотелиальных клеток микрососудов [472]. Отмечаются сообщения, что 12-LOX меняет активность сосудистого фактора интегрин-альфа V-бета 3, необходимого для развития сосудистой стенки [184].

Принято считать, что 12(S)-НЕТЕ через поверхность клеточной мембраны активирует РКС [323], отмечается, что и 12(S)-НЕТЕ через рецепторы в клетке меланомы, через гидролиз инозитола связаны и с GPCRs плазматической мембраны клеток [324]. Окислительный изомер 15(S)-НЕТЕ продвигает развитие сосудов через ангиогенез, связанный с активацией PI3K [504]. Фермент LOX по аминокислотной последовательности имеет схожий с диацилглицерол киназой (diacylglycerol kinase) фрагмент, играющий не последнюю роль в ресинтезе Фи, являющимся посредником активации mAChRs плазматической мембраны клетки [217]. Все эти изложенные факты предполагают связь между LOX и mAChRs плазматической мембраны клетки. Но, несмотря на изложенные данные литературы, связи между продуктами деятельности фермента LOX и работой AChRs плазматической мембраны, за исключением формирования ДК как промежуточного этапа при индуцировании ПОЛ в период 3-часового и 5-дневного охлаждения животных, нами в доступной литературе не найдено.

#### *1.4.3.3. Цитохром P-450 в формировании продуктов перекисного (свободно-радикального) окисления липидов, участие пилокарпина в иницировании ПОЛ цитохромом P-450*

При активации ферментативного ПОЛ, осуществляемого через  $COX_2$ , отмечается создание циклических эндопероксидов с промежуточными этапам в окислении липидов – ДК и ГП. В программе окисления ЖК семейства  $C_{20}$  через увеличение активности фермента LOX отмечается формирование также промежуточных продуктов окисления липидов – НрЕТЕ и также с формированием промежуточного этапа одноэлектронного окисления липидов – ДК [258; 299; 322]. Структурой, участвующей в ферментативном ПОЛ ткани печени, является и цитохром  $P_{450}$  ( $CYP_{450}$ ) – группа гем-тиолатных протеинов, содержащих в качестве протетической группы протопорфирин

IX [296]. В состав белковых доменов с включённым CYP-450 входят гидрофобные аминокислоты и считают, что работа CYP<sub>450</sub> связана с работой МЭРГ [222; 378].

Основной задачей гемопротеинов CYP<sub>450</sub> является подготовка ТФК к окислительному катализу неактивной углерод-водородной связи, достигающаяся тем, что тиольные группы протеинов, содержащиеся в гемовом Fe протопорфирина IX, меняя электронную плотность порфиринового кольца гема, способны входить в резонанс с электронными орбиталями кислорода, активируя ТФК [231; 313]. Гемопротеины CYP<sub>450</sub> участвуют в создании метаболитов при  $\omega$ ,  $\omega$ -1 окислении PUFAs [203], и это явление приводит к образованию в протестическом центре протопорфирина IX из оксиджелезистого (oxyferrous) P<sub>450</sub> пероксильного радикала перокси-P450 с последующим протонированием перокси-радикала P450 и формированием в тройном комплексе CYP<sub>450</sub> гидроперекисных групп [283; 339; 351].

На этапе образования оксиджелезистого P<sub>450</sub> обязательным компонентом является образование супероксидного радикала с дальнейшей его трансформацией в гидроперекись водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [202]. Гетеролитическое расщепление связи O – O механизмом «push – pull» приводит к формированию высокореактивного оксиферил (oxyferyyl)-P450 [461].

Радикальный характер оксиферил-P<sub>450</sub> способствует удалению атома H+ от аллильно и бис-аллильно расположенных метиленовых групп алифатических цепочек PUFAs с возникновением феномена делокализации двойной связи в присутствии ТФК и с последующим формированием ДК у располагающихся вблизи протестической группы CYP<sub>450</sub> ненасыщенных компонентов липидов [392; 493]. Считается, что окислительный потенциал оксиферил-P<sub>450</sub> выше, чем у восстанавливаемого субстрата, разница редокс-потенциала достигает 1,4 вольта, что и является основой для ввода атома кислорода в окисляемый субстрат [313]. Цитохром P<sub>450</sub> производит включение кислорода в структуры ЖК, в отличие от LOX, супрафациально [392; 493].

Выполнение цитохромом P<sub>450</sub> функций монооксигеназ сопровождается образованием перокси-радикала, формированием гидроперекисных групп (при железистом – Fe<sup>2+</sup>), образованием активных форм кислорода (супероксидный радикал, перекись водорода) и образованием оксиферил-P<sub>450</sub>, несущего функции радикала и способного вызывать феномен неспаренной валентности у аллильно и бис-аллильно расположенных метильных групп ненасыщенных компонентов липидов [181]. Считают, что цитохром P<sub>450</sub> способен оксигенировать PUFAs последовательно, окисляя их до состояния НЕТЕ и эпоксидов [335; 391].

Гидроксилирование аллильно и бис-аллильно расположенных метиленовых групп PUFAs называют LOX-подобными эффектами CYP<sub>450</sub> [335]. Второй тип гидроксилирования ЖК Арахиса, вызываемый CYP<sub>450</sub> – это  $\omega$  и  $\omega$ -1 окисление:  $\omega$ -гидроксилаза CYP4A формирует 19- и 20-НЕТЕ,

18-НЕТЕ, 17-НЕТЕ и 16-НЕТЕ с промежуточным этапом образования ДК [196; 409; 458].

Таким образом, по образованию ферильных гидроперекисных групп, образованию ДК через феномен неспаренной валентности у аллильно и бис-аллильно расположенных метильных групп PUFAs, образуемых супероксидным радикалом, оксиферилом  $P_{450}$ , можно судить о участии цитохрома  $P_{450}$  и в ПОЛ.

В создании этих продуктов данный тип реакции является NADP•H-зависимым типом окисления [364; 393] (показанный факт свидетельствует о пероксидазной составляющей в окислении ЖК Арахиса при участии  $CYP_{450}$ ). Эпоксидирование липидов, вызываемых  $CYP_{450}$ , не сопровождается формированием ДК и ГП ЖК и поэтому в данном разделе литературного обзора у нас не вызывают интерес. Из доступных данных литературы нами отмечен факт участия М-холиномиметика пилокарпина в инициировании ПОЛ гепатоцитов  $CYP_{450}$  2A6, 2A13, 2E1 [225].

Таким образом, несмотря на связь между возникновением ферильных гидроперекисных групп, образованием ДК, как результата деятельности супероксидных радикалов, оксиферил- $P_{450}$  при активации  $CYP_{450}$ , данных о влиянии фармакологических агентов, работающих через холинергические механизмы плазматической мембраны гепатоцитов (кроме данных о пилокарпине, иницирующем ПОЛ гепатоцитов с участием  $CYP_{450}$  2A6, 2A<sub>13</sub>, 2E<sub>1</sub>) нами не отмечено, и поэтому исследования, посвящённые изучению изменения содержания продуктов ПОЛ в период 3-часового и 5-дневного охлаждения животных, и введения холинотропных веществ, возможно с участием цитохрома  $P_{450}$  ( $CYP_{450}$ ), представляет, безусловно, несомненный интерес.

## **1.5. Влияние холинотропных средств на изменение содержания субстратных составляющих перекисного (свободно-радикального) окисления липидов**

### **1.5.1. Молекулярный кислород, активные формы кислорода, 2,3-ДФГ в эритроцитах крови животных и холинотропные средства**

Принято считать, что присутствие молекулярного кислорода в тканевой среде создаёт условие для развития ПОЛ с дальнейшей трактовкой его, как субстрата, обеспечивающего развитие ПОЛ [49; 133]. Из данных литературы видно, что изменение парциального напряжения кислорода в биологической среде приводит к изменению содержания циклических эндопероксидов – изопростанов, изофуранов [425]. Экспериментальными работами показано влияние фармакологических агентов – агонистов и антагонистов холинергических структур плазматической мембраны клеток – на измене-

ние потребления кислорода организмом экспериментальных животных периода длительной холодовой нагрузки [116; 117]. По данным литературы, в наружных орбиталях атома кислорода (2P<sub>Y</sub> и 2P<sub>Z</sub>) присутствуют электроны с однонаправленными спинами, способные восстанавливаться, принимая электроны, а также реагировать с соединениями, имеющими на своих орбиталях энергию неспаренных электронов [87; 499]. Изменение связей между атомами в молекуле кислорода требует внесения извне дополнительной энергии, определяемой в 490 кДж / моль [87; 499].

В условиях биологической среды ТФК в присутствии катализаторов, какими могут быть ионы щелочных металлов K<sup>+</sup> и Na<sup>+</sup>, или в условиях присутствия одного из ионов щелочно-земельных металлов – Ca<sup>2+</sup>, кислород способен достаточно быстро изменять конфигурацию наружных орбиталей с проявлением возможности присоединения к органическим соединениям без затраты дополнительной энергии [207]. По всей видимости, изменение энергетической конфигурации наружных орбиталей ТФК в присутствии выше упомянутых катализаторов приводит к формированию АФК [189]. Включение в наружные орбитали молекулы кислорода одного электрона сопровождается возникновением состояния супероксидного анион-радикала [151]. Считают, что в отличие от многих молекул с неспаренным электроном, супероксидный анион-радикал достаточно инертен и в водных системах: его соединение реакцией дисмутации с подобной молекулой приводит к формированию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [177; 252].

В ткани печени супероксидный анион-радикал возникает как результат одноэлектронного восстановления кислорода при аутоокислительных реакциях, содержащих NADP•H оксидазы (глюкозооксидаза, ксантинооксидаза, альдегидоксидаза) [177; 181; 189; 252; 334; 354]. Следует отметить, что стимуляцию активности NADP • H оксидаз вызывают и ангиотензин II [265], и фактор некроза опухоли-альфа (TNF-alpha) [251], связанный с механизмами GPCRs плазматических мембран. Активность NADP•H оксидаз связана и с гипоксией, возникающей при реоксигенации, реперфузии органов [503].

Другой источник супероксидного анион-радикала в ткани печени – это оксидоредуктазная ферментная система, состоящая из металлофлавопротеидов, находящихся на поверхности эндотелия сосудов печени в двух формах – XD и XO, катализирующая окисление гипоксантина и переход к ксантину при метаболизме пуринов [354]. Семейство NOS, располагающихся в эндотелиальных клетках стенки сосудов, также является источником возникновения супероксидного анион-радикала [172]. Дополнительным источником в тканях супероксидного анион-радикала являются, как мы уже отмечали, и синтаза CYP – P<sub>450</sub> 2C<sub>9</sub> [245], фермент LOX [317], митохондрии гепатоцитов [177]. Другим видом АФК в тканях является синглетный кислород – в обычном состоянии реакция неконъюгированного гидроперекисного радикала, образующегося в результате реакции Хабер-Вейса с супероксидным анион-радикалом, приводит к образованию синглетного кислорода [151].

Данные литературы показывают, что введение галантамина (блокатор АСhE) демонстрирует цитопротекторный эффект, возникающий в стенке микрососудов за счёт уменьшения продукции гидроперекисного радикала, и это в значительной степени уменьшает гибель эндотелиальных клеток сосудов от АФК [149], но в литературе отмечаются и факты, свидетельствующие, что присутствие супероксидного анион-радикала в стенке аорты мышей с вызванным сахарным диабетом уменьшает релаксирующий эффект АХ, действующего на гладкую мускулатуру стенок сосудов [304].

Отмечено, что присутствие никотина в инкубационной среде, совместно с перитонеальными макрофагами, влияет на продукцию супероксидного анион-радикала [337]. Подчёркиваются факты, что введение никотина (6 мг/кг) в течение 7 дней молодым, взрослым и старым крысам увеличивает содержание реактивных видов кислорода [291], поступление табачного дыма с никотином способствует формированию кислородных радикалов в ткани лёгких [341]. Хотя отмечаются данные, что накопление эндогенного АХ в ткани мозга препятствует чрезмерному образованию АФК [479].

На препаратах, полученных от морской свинки и содержащих гладкомышечную ткань с мезентериальным нервным сплетением, добавление  $\text{H}_2\text{O}_2$  мольной концентрации 5 мМ значительно увеличивало базальное освобождение АЦХ гладкомышечной ткани [360].

В работе В.И. Тиханова показано, что введение фармакологического агента неостигмина, увеличивающего накопление эндогенного АХ в тканях, увеличивает способность гомогената печени продуцировать АФК [127; 128].

Таким образом, данные о возможном влиянии фармакологических агентов, работающих через холинергические механизмы плазматических мембран гепатоцитов на АФК, разнообразны и противоречивы, поэтому необходимо в эксперименте оценить содержание ТФК в ткани печени, способности ткани печени продуцировать АФК периода 3-часовых и 5-дневных холодовых нагрузок и действию на ткань печени накопленного эндогенного АХ, АХ вводимого в печень *in situ* и введении прямых агонистов и антагонистов периферических mAChRs и nAChRs ткани печени на протяжении 5 дней действия холода.

Из данных литературы отмечено, что снабжение кислородом тканей организма связано со способностью гемоглобина эритроцитов связывать кислород [90]. Присоединение кислорода к гемоглобину эритроцита зависит от многих внутриэритроцитарных факторов, но определяющее значение в этом процессе всё-таки отдают внутриэритроцитарному метаболиту 2,3-дифосфоглицерату (2,3-ДФГ), на синтез которого расходуется до 90% потребляемой эритроцитом глюкозы [21]. В эритроцитах 2,3-ДФГ – динамичный показатель связывания и отдачи кислорода периферическим тканям, он образуется из 1,3-дифосфоглицерата дифосфоглицератмутазой, и присутствие 2,3-ДФГ эритроцитов увеличивает сродство Hb к кислороду в 26 раз [98]. Так, по данным А.К. Байшукуровой [9], увеличение кислорода во внешней

среде приводит к снижению 2,3-ДФГ эритроцитов и, наоборот, снижение кислорода внешней среды приводит к росту 2,3-ДФГ эритроцитов крови. Считают, что 2,3-ДФГ является аллостерическим регулятором связывания кислорода с Hb, снижение 2,3-ДФГ в эритроцитах повышает сродство Hb к кислороду, и это уменьшает поступление кислорода в ткани [97].

В работе В.И. Тиханова [117] отмечено изменение поглощения кислорода внешней среды экспериментальными животными при введении центральных и периферических М,Н-холиномиметиков, центральных и периферических М,Н-холиноблокаторов в период 28-дневной холодовой нагрузки, но данных литературы о влиянии периферических М,Н-холиномиметиков и периферических М,Н-холинолитиков на содержание 2,3-ДФГ в эритроцитах крови при формировании продуктов ПОЛ печени в периоды 3-часовой и 5-дневных холодовых нагрузок у лабораторных животных в доступной литературе нами не найдено.

### **1.5.2. Холинотропные средства и свободные жирных кислот крови. Связь эйкозаноидов, оксипинов с GPCRs плазматической мембраны клетки**

Фармакологические агенты, взаимодействующие с холинергическими структурами плазматических мембран клетки, участвуют в регуляции уровня СЖК крови [31; 34; 36]. Так, работами В.Н. Гурина, Ю.И. Богрицевича, П.П. Денисенко показано, что введение ареколина в условиях предварительной блокады периферических М-холинорецепторов приводит к повышению уровня СЖК крови [31; 34]. Аналогичные результаты были получены и В.В. Царюком при введении ареколина в желудочки мозга [135]. Введение центрального М-холиноблокатора амизила животным в условиях стресса (лапаротомия) препятствовало повышению уровня СЖК крови [32]. Возбуждение центральных Н-холинореактивных структур никотином на фоне блокады периферических Н-холинорецепторов не сопровождалось повышением уровня СЖК крови. В то же время, введение никотина без предварительной блокады периферических Н-холинорецепторов увеличивало содержание СЖК [30; 36].

В экспериментальных работах отмечено, что периферические М-холинорецепторы ответственны и за утилизацию СЖК периферическими тканями [34; 41]. Отмечается изменение потребления СЖК теплопродуцирующими тканями (печень, скелетная мускулатура) в период 28-дневной холодовой нагрузки при изменении активности периферических М-холинорецепторов [118], и при этом считается, что периферические Н-холинорецепторы являются коллектором, через который осуществляется липолиз жировой ткани в период холодовых нагрузок и регуляции СЖК крови [31].

Отмечается в литературе и роль холинергических структур, связанная и с включением ЖК в ткань центральной нервной системы [224; 297; 298].

Так как феномен ПОЛ связан в первую очередь с  $\omega$ -окислением ЖК [200; 221; 488], и считают, что субстратом для  $\omega$ -окисления ЖК являются эйкозаноиды – ЖК семейства  $C_{20}$  [345; 375], то данные литературы отмечают, что появление СЖК семейства  $C_{20}$  в цитозоле клетки – это результат поступления как эстерифицированных эйкозаноидов в составе триглицеридов, глицерофосфолипидов, так и неэстерифицированных ЖК семейства  $C_{20}$  из сосудистого русла при холодových нагрузках [30; 45; 51; 62].

Считают, что в понимание эйкозаноиды входят ЖК семейства  $\omega$ -9 – ЖК DGLA; ЖК семейства  $\omega$ -6 – ЖК Арахидон и ЖК семейства  $\omega$ -3 – ЖК Эйкоза [345], трактуемые на сегодняшний день, как липидные медиаторы клетки, участвующие в окислительном стрессе [380; 469].

В данных литературы отмечено, что введение животным ЖК семейства  $\omega$ -3 сопровождается возникновением дисфункции эндотелия сосудов, и это явление приводит к возникновению состояния окислительного стресса в созданной экспериментальной менопаузе [262]. Результатом ферментативного гидроксилирования эйкозаноидов (превращение связи углерод-водород в углерод-кислородную связь) является способность трансформироваться в  $PG_2$ , простагландины и тромбоксаны [285; 310], и подобное гидроксилирование позволяет объединить их под термином простагландины [380], а в случае активации неферментативного ПОЛ эйкозаноидов формируются соединения, называемые изопростаны [424].

Оксигенация липидов всех классов в клетке происходящая при индуцировании ПОЛ в клетке предопределяет и появление термина оксилипины [22; 384; 466], синтезирующихся в клетке, как правило *de novo* при активации сигнальных схем клетки [384]. Считают, что с пониманием оксилипины более тесно связаны эйкозаноиды [369]. Отмечено, что ферментативное гидроксилирование эйкозаноидов ферментами семейства COX, LOX, CYP<sub>450</sub> поддерживает уровень синтеза оксилипинов клетки [451]. Оксилипины, имеющие в своей основе алифатическую структуру  $C_{20}$  из цитозоля клетки, способны диффундировать через плазматическую мембрану и связываться с механизмами GPCRs плазматической мембраны клетки [451].

Отмечено, что после внутривенного введения животным ЖК Эйкоза и ЖК Докоза в течении 15 минут до 90% от введённого объёма PUFAs включены во 2-ю позицию фосфолипидов плазматических мембран клеток [373], а результатом последующего оксигенирования эстерифицированных ЖК ферментативными и неферментативными механизмами ПОЛ является формирование OxPLs: PEIPC, PECPC и POVPC [170].

### 1.5.3. Резюме к главе 1

Таким образом, при кратковременной и длительной холодových нагрузках, создаваемых животным, показана работа фармакологических веществ, возбуждающих либо блокирующих центральные и периферические

М-,Н- холинореактивные структуры плазматических мембран клетки, трактуемых как канал управления приспособительными процессами [33; 35; 39; 42]. Но не изученным остаётся вопрос о возможном влиянии накопления эндогенного АХ, АХ, вводимого в ткань печени *in situ*, отдельного влияния эндогенного АХ на периферические мускарино- и никотиночувствительные холинореактивные структуры плазматических мембран гепатоцитов, проявления феномена реципрокности при введении прямых агонистов и антагонистов периферическим mAChRs и nAChRs и влияния на продукты, субстратные составляющие ПОЛ печени, влияния на условия, способствующие развитию ПОЛ печени периода 3-часовых и 5-дневных холодовых нагрузок, создаваемых лабораторным животным.

Поэтому литературные данные позволяют сделать вывод о возникновении, развитии механизмов ПОЛ, формирования продуктов ПОЛ, о содержании субстратных составляющих ПОЛ, об условиях, способствующих развитию ПОЛ, однако участие периферических М- и Н-холинореактивных структур плазматической мембраны печени периода 3-часовых и 5-дневных холодовых нагрузок в упомянутых процессах нами в доступной литературе не найдено, в связи с чем и выполнена данная работа. Мы исходили из того, что закономерности, наблюдаемые в медиаторных процессах синаптической передачи нервного импульса (синаптические холинергические процессы) в целом могут воспроизводиться и в случае с немедиаторным АХ и его рецепторами, взяв в качестве такого примера разные свободно-радикальные реакции печени. Последние, как известно, не управляются напрямую холинергическими нейронами (в данном случае из блуждающего нерва), а представляют собой типичный пример не-нейрональной функции АХ. Это ставило цель еще более необычную, чем медиаторная функция АХ в клетках крови, например, лимфоцитах, которые можно рассматривать как отдельную клеточную систему с типичными механизмами реагирования на холинергические вещества.

## ГЛАВА 2

# МЕТОДОЛОГИЯ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы

Опыты проведены на 1860 крысах самцах Вистар массой 150-200 граммов. В каждой серии экспериментов использовали животных одной массы. Проведено 186 серий опытов. В каждой группе было по 10 животных. Выбор экспериментальных животных основывался на задачах экспериментов, связанных с феноменом стресса [76; 108; 448]. Крысы как объект исследования (для выяснения влияния фармакологических агентов, взаимодействующих с холинергическими структурами плазматических мембран клеток, на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ, влияния на изменение условий, способствующих развитию ПОЛ печени в период 3-часовых и 5-дневных холодовых нагрузок) были выбраны по следующим соображениям: а) для данного вида животных отмечается динамичность в индуцировании механизмов ферментативного и неферментативного ПОЛ ткани печени [17; 18; 45]; б) действие фармакологических веществ, влияющих на холинергические механизмы плазматической мембраны клетки при остром [13] и хроническом [116] воздействии холода, оценивали также на белых крысах, преимущественно Вистар; в) белые крысы Вистар являются удобной моделью изучения изменений ПОЛ печени и в условиях холодовых нагрузок [46].

При выполнении работы внимание уделялось содержанию животных в идентичных условиях. Перед началом эксперимента животные не менее 10 дней получали полноценный пищевой рацион, в соответствии с существующими нормами содержания лабораторных животных, с соблюдением режима кормления, тепла, без ограничения доступа к питьевой воде [180; 361].

Изменения у животных возникают в модели стресса, связанной с холодовой нагрузкой и в ткани печени [432], и к тому же ткань печени является достаточно удобной моделью для инициирования ПОЛ [404].

Так как исследования связаны с определением продуктов ПОЛ печени, а работа жирнокислотного цикла у экспериментальных животных зависит от времени суток и продолжительности голодания [167], то все эксперименты проводили в одно и тоже время суток в 8-11 ч утра, при температуре окружающего воздуха +24°C, что соответствует термонеutralным условиям для данного вида животных [186].

Животных брали в опыты после 12-часового ночного голодания, что приводит к исчерпыванию резервов глюкозы в форме гликогена печени и является важным фактором стандартизации условий проведения экспери-

мента, нивелирования индивидуальных особенностей обмена и липидов печени [143; 430].

Животные были распределены по группам – животные группы контроль-1 (интактные) содержались в стандартных условиях вивария, группа животных контроль-2 (холод) подвергалась только охлаждению. Животным группы контроль-1 и контроль-2 в одно и тоже время в/бр вводили только физиологический раствор. Животным опытных групп за 30 мин до охлаждения вводили в/бр фармакологические агенты в зависимости от решения поставленных задач.

Для создания холодовой нагрузки животных опытной группы и животных группы контроль-2 помещали в климатоканеру при температуре  $-12^{\circ}\text{C}$  на протяжении 3 ч и по 3 ч в течение 5-ти дней [119]. Животные при охлаждении находились в свободном состоянии. В работе климатоканеры предусматривался световой режим и подача воздуха для предупреждения гипоксии [238]. Контролем служили животные, находящиеся в климатоканере при температуре  $+20\text{-}22^{\circ}\text{C}$ , не подвергавшиеся действию холода.

## 2.2. Реактивы, фармакологические препараты, фармакологические методы

### 2.2.1. Реактивы

- В работе были использованы следующие химические реактивы:
- 2-тиобарбитуровая кислота (Eastman Kodak company, USA) хч;
  - $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \times 6 \text{H}_2\text{O}$  (соль Мора, Россия), хч;
  - NADP $\cdot$ H-восстановленный никотинамид динуклеотид (Reanal, Венгрия), хч;
  - Аммиак (фиксанал, Россия), хч;
  - Аскорбиновая кислота (Sigma, USA), хч;
  - Азотнокислый магний (Россия), чда;
  - Гидрокись алюминия (Россия), чда;
  - Глюкозооксидаза (Sigma, USA), хч;
  - Гексоцианоферритин (красная кровяная соль, Россия), хч;
  - KCl (Baker analyzed, USA), хч;
  - Метанол (Россия), ч;
  - Молибдат аммония (Россия), чда;
  - Мышьяковистый натрий (Россия), чда;
  - Лимоннокислый натрий (Россия), чда;
  - Фосфорно-кислый натрий, однозамещённый (Россия), чда;
  - Фосфорно-кислый калий, двухзамещённый (Россия), чда;
  - Пирофосфат Na (Sigma, USA), хч;
  - Силикагель (Lachema, Brno) 100/160 меш, для хроматографии;
  - Соляная кислота (фиксанал, Россия), хч;

- Серная кислота (фиксанал, Россия), хч;
- Тиоционат аммония (Sigma, USA), хч;
- Амино-метановый (трис – HCl) буфер (Sigma, USA), хч;
- Трихлоруксусная кислота (Россия), чда;
- Уксусная кислота (фиксанал, Россия), хч;
- Фосфорно-вольфрамовая кислота (Россия), чда;
- Хлороформ (Россия), хч;
- ЭДТА динатриевая соль (Fisher Scientific Company, USA), хч;
- Этанол (Россия), хч;
- Метилловые эфиры жирных кислот (37 Suspelco test mix, USA), эталон.

Хлороформ, этанол, метанол перегоняли методом возгонки на роторном испарителе ИР-1М2 (Россия). В качестве сорбента для колоночной хроматографии использовали гидроксид алюминия ( $AlOH_3$ ), обработанную по Брокману [54]. В тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовали силикагель для хроматографии, хранили в склянке под слоем равного объема воды и использовали по мере необходимости для приготовления пластинок для ТСХ.

### 2.2.2. Фармакологические агенты

Для фармакологического анализа использовали субстанции антихолинэстеразного препарата неостигмина (прозерина), ацетилхолин (АХ) кристаллический, М-холинолитик атропина сульфат, Н-холинолитик гексаметоний (бензогексоний), синтетический М-холинолитик метацин, М-холиномиметик пилокарпин, Н-холиномиметик никотин. Большинство фармакологических агентов-анализаторов были производства Sigma-Aldrich, США.

### 2.2.3. Фармакологические методы

Для выяснения особенностей формирования продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ, выяснения особенностей влияния условий, способствующих формированию ПОЛ печени периода охлаждения животных и возбуждения периферических mAChRs, nAChRs плазматических мембран гепатоцитов, требовалось выбрать фармакологический агент, накапливающий эндогенный АХ в ткани печени. Нами был выбран неостигмин, поскольку присутствие азота с четвертичной валентностью в структуре молекулы [385; 502] вызывает в основном периферические холиномиметические эффекты: в дозе 0,2 мг/кг неостигмин вызывает обильную саливацию [2], лакримацию [72; 204], о возбуждении периферических nAChRs неостигмином судили по единичным сокращениям поперечнополосатой мускулатуры животных [71]. Неостигмин вводили за 30 мин до охлаждения животных в климатокамере. Накопление эндогенного АХ в ткани печени, достигавшегося введением неостигмина при предварительном введении животным

соответствующих периферических М- или Н-холиноблокаторов позволяло модулировать эффект периферических Н- и М-холиномиметиков. Предложенная модель периферических М,Н-холиномиметиков приводит к возбуждению периферических mAChRs и nAChRs эндогенным АХ [72].

При выборе периферического М-холиноблокатора, вводимого перед неостигмином, применяли М-холинолитик, у которого бы преобладал периферический эффект. Этим требованиям удовлетворял неселективный М-холинолитик атропина сульфат, в дозе 1 мг/кг он не оказывает ещё заметного центрального М-холинолитического действия [2; 3; 4; 5; 43], но предупреждает ареколиновую саливацию [39; 43]. Применяя практику индуцирования ПОЛ *in vitro* нами применялся атропин *in vivo* и в дозе 0,1 мг/кг [121].

Данные Н.А. Лосева [73] свидетельствуют, что при совместном применении неостигмина с метацином периферический М-холиноблокатор метацин усиливает холинопотенцирующее действие неостигмина. Согласно данным литературы, атропин реализует М-холинолитический эффект через G-протеиновый механизм плазматической мембраны клеток [153; 154; 228; 264; 287; 302; 508].

Для создания модели периферического М-холиномиметика, возбуждающего периферические mAChRs гепатоцитов эндогенным АХ, перед введением неостигмина требовалось предварительное введение периферического Н-холиноблокатора, нами был предложен гексаметоний [72]. Основанием для выбора данного соединения послужили данные о липидотропности гексаметония [146; 197], данные о его свойствах как неселективного, периферического антагониста со смешанной (конкурентной и неконкурентной) активностью в отношении периферических nAChRs [396], являющегося блокатором nAChRs ионных каналов плазматической мембраны клеток и связанного с пулом внеклеточного  $Ca^{2+}$  [474].

При создании моделей периферических М,Н-холиномиметиков все периферические М,Н-холиноблокаторы вводили предварительно за 30 мин до введения неостигмина.

Для получения эффекта реципрокности [72] в качестве периферического М-холинолитика применяли эфир бензиловой кислоты и триметиламиноэтанола – метацин [79].

Для подтверждения или опровержения фактов, получаемых при возбуждении периферических mAChRs и nAChRs плазматических мембран гепатоцитов эндогенным АХ, был применён метод, заключающийся в повторении профиля экспериментов, связанных с определением продуктов и субстратных составляющих ПОЛ печени, но с применением прямых, неселективных М,Н-холиномиметиков и периферических М,Н-холиноблокаторов [73].

В выборе прямого М-холиномиметика остановились на пилокарпине, обосновывая своё решение тем, что в структуре молекулы пилокарпина присутствие метиленового мостика [2], соединяющего между собой имидазольное и лактоновые кольца увеличивает подвижность кольцевых структур

пилокарпина, приближая углеродные атомы к атому азота и кислорода на расстояние, возникающее между атомами азота и кислорода в молекуле АХ.

К тому же изменение расстояния между атомом азота имидазольного кольца и кислорода лактонового кольца пилокарпина соответствует феномену 5 углеродных атомов, присутствующего в молекуле АХ [48]. По современным данным, такая подвижность в кольцевых структурах пилокарпина позволяет пилокарпину работать и с  $m_1$ АChRs,  $m_2$ АChRs и  $m_3$ АChRs [121].

В выборе периферического, неселективного М-холиноблокатора мы остановились на атропине, обосновывая выбор тем, что комбинация фармакологических агентов – периферического М-холиномиметика пилокарпина (10 мг/кг) и периферического М-холинолитика атропина (1 мг/кг) на сегодняшний день применяется как устоявшееся сочетание фармакологических агентов при определении феномена реципрокности [185]. К тому же, по данным литературы, применение фармакологических агентов пилокарпина и атропина использовалось и в изучении феномена окислительного стресса [225; 394; 497]. Поэтому для выяснения факта реципрокности при изучении содержания продуктов ПОЛ печени, индуцированного 3-часовой и 5-дневными холодowymi нагрузками применяли упомянутые фармакологические препараты.

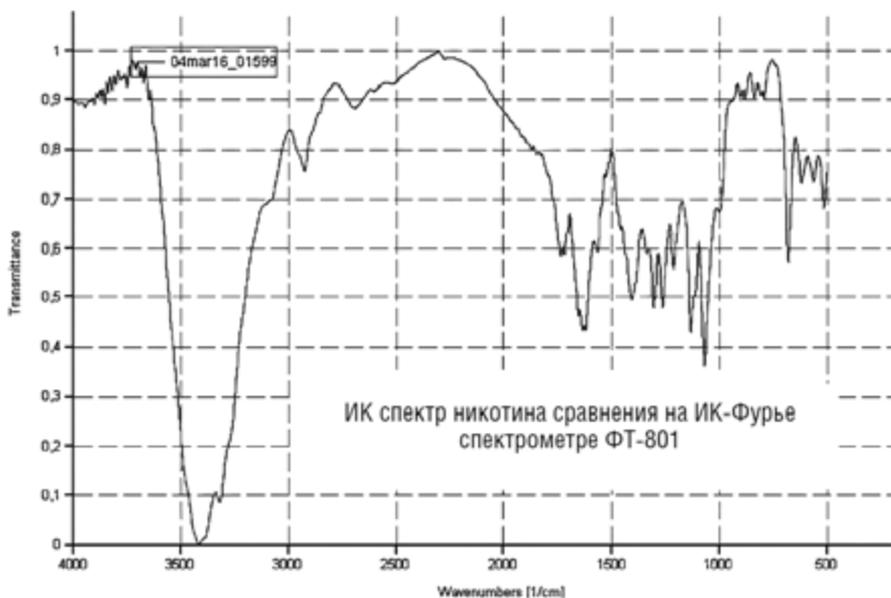
В выборе холиномиметика, возбуждающего nAChRs плазматических мембран гепатоцитов, мы остановились на классическом агонисте nAChRs – никотине. Никотин, полученный из метанольного экстракта листьев табака, подвергали очистке методом колоночной хроматографии, на предварительно активированном силикагеле в 100-160 меш, при температуре +400°C с добавлением безводного сульфата натрия, активированного также при температуре +200°C [286].

Элюирование никотина сульфата с силикагеля хроматографической колонки производили метанолом с последующим выпариванием на роторном испарителе. Взвешивание массы, содержащей никотина сульфат, производили гравиметрическим методом. Режим прогрева колонки при определении никотина методом газовой хроматографии основывался на данных литературы, полученных при оценке содержания никотина в листьях табака [286]. Для сравнения метанольных экстрактов, содержащих никотина сульфат из листьев табака и никотина сравнения (гидротартрата), производили сравнение хроматограмм по времени выхода пика никотина и температуры прогрева колонки, при которой отмечался выход никотина (рис. 11).

Для окончательного заключения о содержании никотина в предлагаемых образцах экстрактов из листьев табака, было произведено сопоставление данных ИК спектрофотометрии экстракта, полученного из листьев табака (рис. 12) и данных ИК спектрофотометрии никотина (рис. 13) используемого как эталон сравнения на приборе ИК–Фурье спектрометр ФТ-801. При этом соблюдали тождественные параметры записи спектров: усиление – 1 крат, разрешение –  $4 \text{ см}^{-1}$ , наложение (накопление) до 30 спектров.



**Рис. 11.** Хроматограммы метанольных экстрактов, содержащих никотин  
Цифра 1 на хроматограмме представляет выход никотина гидротартрата (50 мкг), рассматриваемого как эталон; цифра 2 – выход никотина сульфата (505 мкг), полученного из листьев табака.



**Рис. 12.** ИК-спектр никотина гидротартрата, представленного в качестве препарата сравнения

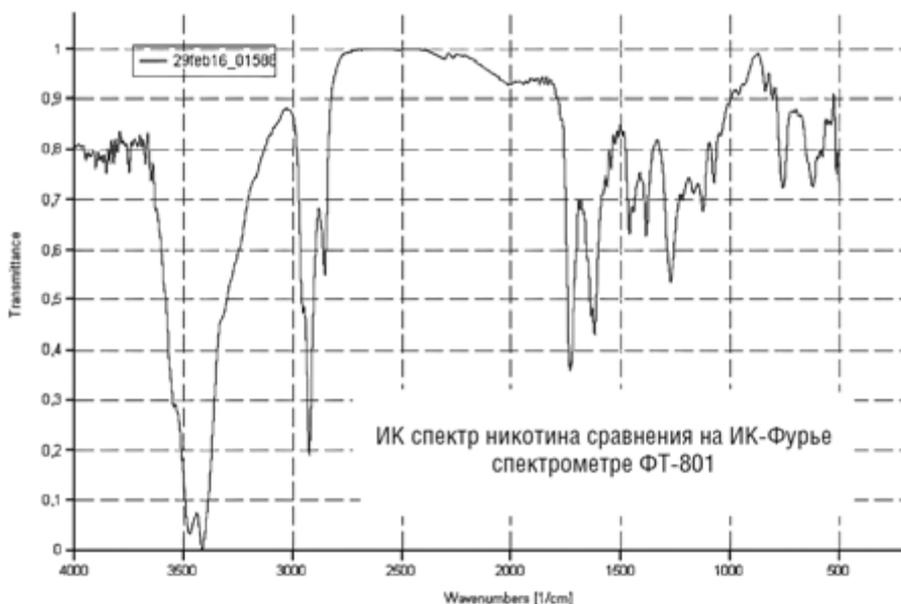


Рис. 13. ИК-спектр никотина сульфата, полученного из листьев табака

Присутствие никотина в экстрактах листьев табака было идентифицировано и на биологическом объекте по способности индуцировать клонико-тонические судороги внутривентральным введением 0,1% раствора никотина (рН = 8) [71; 74].

Отмечали возникновение судорог в поперечнополосатой мускулатуре животного, в том числе и передних конечностей, повышение частоты и амплитуды дыхания, а также повышение общей двигательной активности животного.

Идентификация никотина сульфата, полученного из листьев табака, по клонико-тоническим судорогам сопоставляли с данными, полученными и при введении никотина гидротартрата, используемого, как препарат сравнения. Так, никотина гидротартрат вызывает вышеперечисленные фармакологические эффекты в дозе 13 мг/кг, а никотина сульфат, полученный нами из листьев табака, в дозе 51 мг/кг.

При оценке действия никотина на биологическую ткань, данные при введении никотина сульфата, полученного из листьев табака, сопоставляли с данными эталонного никотина (никотина гидротартрата) и при определении содержания глюкозы крови крыс [73]. Содержание глюкозы крови оценивали спектрофотометрически на основе глюкозооксидазного метода [250]. Было отмечено, что введение никотина гидротартрата (препарат сравнения) в дозе 0,5 мг/кг вызывал повышение глюкозы крови через 5 мин в 1,22 раза; через 10 мин – в 1,58 раза и через 20 мин – в 1,39 раза в сравнении с данными контроля. Введение никотина сульфата, полученного из листьев табака, животным в дозе 5 мг/кг вызывало повышение уровня глюкозы через 5 мин

в 1,35 раза; через 10 мин – в 1,16 раза (табл. 1). А никотина сульфат, полученный из листьев табака, и вводимый животным в дозе 0,5 мг/кг, повышал содержание глюкозы крови через 5 мин в 1,19 раза, а через 10 мин – повышал на 9,6%. Данные, полученные в экспериментах при определении глюкозы крови, позволили определиться с дозами никотина, полученного из листьев табака и используемого для дальнейшей работы. Так, дозы никотина сульфата, вводимого животным, определялись нами как 0,5 мг/кг и 5 мг/кг.

Никотина сульфат инкубационной среды мольной концентрации  $10^{-6}$  М вызывал изменения ПОЛ микросом печени, и поэтому доза никотина сульфата 0,05 мг/кг, полученного из листьев табака (данная доза никотина сульфата соответствует мольной концентрации никотина  $10^{-6}$  М в инкубационной среде) нами также вводилась экспериментальным животным.

**Табл. 1.** Изменение содержания глюкозы крови крыс (ммоль/л) после внутрибрюшинного введения никотина сульфата и никотина гидротартрата

1-ая группа, контроль (интактные) n= 10	2-ая группа (через 5 мин после введения никотина) n=10	3-ья группа (через 10 мин после введения никотина) n=10	4-ая группа (через 20 мин после введения никотина) n=10	5-ая группа (через 30 мин после введения никотина) n=10
Внутрибрюшинное введение животным никотина гидротартрата 0,5 мг/кг				
5,04 [4,8 ÷ 4,9]	6,18 [5,8 ÷ 6,5] $P_{2-1} = 0,00216$	7,98 [7,6 ÷ 8,2] $P_{3-1} = 0,000297$ $P_{3-2} = 0,00394$	7,05 [6,8 ÷ 7,2] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,000297$ $P_{4-3} = 0,00394$	7,5 [7,1 ÷ 7,8] $P_{5-1} = 0,00216$ $P_{5-2} = 0,00394$ $P_{5-3} = 0,00648$ $P_{5-4} = 0,0104$
Внутрибрюшинное введение животным никотина сульфата 5 мг/кг, полученного из листьев табака				
4,5 [4,2 ÷ 4,9]	6,09 [5,86 ÷ 6,32] $P_{2-1} = 0,00216$	5,25 [4,97 ÷ 5,8] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,00216$	6,15 [5,9 ÷ 6,8] $P_{4-1} = 0,00216$ $P_{4-2} = 0,588$ $P_{4-3} = 0,00394$	6,06 [5,8 ÷ 6,4] $P_{5-1} = 0,00394$ $P_{5-2} = 0,818$ $P_{5-3} = 0,00216$ $P_{5-4} = 0,414$
Внутрибрюшинное введение животным никотина сульфата 0,5 мг/кг, полученного из листьев табака				
4,96 [4,72 ÷ 5,3]	5,91 [5,6 ÷ 6,12] $P_{2-1} = 0,00216$	5,44 [5,38 ÷ 5,6] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,00216$	5,0 [4,78 ÷ 5,4] $P_{4-1} = 0,937$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00394$	4,85 [4,11 ÷ 5,18] $P_{5-1} = 0,336$ $P_{5-2} = 0,00394$ $P_{5-3} = 0,00216$ $P_{5-4} = 0,309$

Примечание: здесь и далее в таблицах количественные значения представлены в виде медианы и процентилей (5-й и 95-й процентиля).

## **2.2.4. Расчёт концентрации фармакологического агента, применяемого *in vitro* и *in vivo***

Для сопоставления результатов экспериментов, проводимых *in vivo*, с результатами экспериментов, проведенных *in vitro*, с применением выбранного фармакологического агента необходимо было выверить и сопоставить мольную концентрацию холинотропного вещества, работающего *in vitro*, с дозой фармакологического агента, применяемого *in vivo*. Учитывая, что объём крови экспериментального животного составляет 1/15 массы тела [88], сопоставляя рассчитанный объём крови с молекулярной массой фармакологического вещества, оценивали мольную концентрацию фармакологического соединения, работающего *in vivo*. Высчитав мольную концентрацию фармакологического соединения, применяемого *in vivo*, эквивалент мольной концентрации фармакологического агента использовали и *in vitro*. Таким образом, на наш взгляд, корректно сопоставлялись полученные в экспериментах результаты, проведенные с одним и тем же фармакологическим агентом, при определении продуктов окисления липидов печени как *in vivo*, так и *in vitro*.

## **2.3. Препаративные методы**

### **2.3.1. Приготовление гомогената печени**

После декапитации крыс и вскрытия брюшной и грудной полостей, для удаления гемоглобина из сосудистого русла, из ткани печени, через канюлю, введённую в сердце и нижнюю полую вену, печень перфузировали раствором 5мМ трис – HCl буфера (pH = 7,4), с содержанием 0,15 М KCl до светло-жёлтого цвета. После этого печень взвешивали, измельчали и обрабатывали в гомогенизаторе Даунса, в соотношении с трис – HCl буфером как 1 : 3 в течении 1 мин [55]. В дальнейшем приготовленный гомогенат печени использовали для определения содержания в нём молекулярного кислорода и МДА. Из гомогената печени готовили и липидный экстракт печени.

### **2.3.2. Экстракция общих липидов из гомогената печени**

Экстракцию липидов из гомогената печени производили методами Фолча [247] и Блайя – Дайлера [56; 169]. Согласно метода Фолча, к 2,5 мл гомогената печени добавляли 4,5 мл смеси хлороформ : метанол в массо-объёмном соотношении с гомогенатом печени 1 : 2. Содержимое тщательно перемешивали через каждые 10–15 мин и оставляли при температуре +4°C в течение 2 ч (или оставляли на ночь в морозильной камере при температуре –20°C). Центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10–15 мин, осаждая

гомогенат печени. Надосадочную жидкость собирали в пустые пробирки, а в осадок гомогената печени повторно добавляли 5,7 мл смеси хлороформ : метанол : вода (соотношение 1 : 2 : 0,8 по объёму) и проводили повторную экстракцию липидов методом Блайя – Дайлера. Задачей выполнения этого раздела экстракции липидов было извлечение большей частью полярных липидных соединений [457]. Экстракты из гомогената печени затем объединяли, к ним добавляли воду и хлороформ из расчёта 1 мл воды и 1,5 мл хлороформа, перемешивали, центрифугировали при 3000 об/мин для расслоения фаз в течении 15 минут. Нижнюю хлороформенную фазу, содержащую фракцию общих липидов, упаривали на ротаторном испарителе с созданием вакуума, при температуре возгонки хлороформа +45°C. Затем ОЛ растворяли в 2 мл перегнанного под вакуумом этилового спирта и хранили при –20°C [16].

### **2.3.3. Выделение фракции свободных жирных кислот печени из общих липидов печени**

После получения фракции ОЛ печени и растворения ОЛ в органическом растворителе (бензол), липиды наносили на ТСХ–пластинку микрошприцом МШ-10 М [92]. Нейтральные липиды (фракция СЖК, триглицериды, эфиры холестерина) отделяли от полярных липидов фракции ОЛ печени в системе растворителей: гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота (70:30:1, соотношение по объёму) [92; 308] без доступа воздуха. Маркировали фракцию СЖК по метке, содержащей пальмитиновую кислоту [418]. Обнаружение фракции СЖК печени производили неспецифическим методом выявления липидов на ТСХ–пластинках, помещая хроматограммы в сосуд с парами йода и дальнейшей возгонкой йода с пластинки ТСХ нагреванием, без доступа воздуха [92; 111].

### **2.3.4. Выделение мембран эндоплазматического ретикулула гепатоцитов (микросомы печени)**

После декапитации животных и вскрытия брюшной, грудной полостей для удаления гемоглобина из сосудистого русла, из ткани печени через канюлю, введённую в сердце и нижнюю полую вену, печень *in situ* перфузировали 5 мМ раствором трис–НСl буфера (рН = 7,4), с содержанием 0,15 М КСl. Печень удаляли из брюшной полости животного, отжимали на марлевой салфетке, взвешивали и измельчали ножницами. Гомогенат печени готовили в гомогенизаторе Даунса, с трис–НСl буфером, в массо-объёмном соотношении 1 : 3. Все процедуры проводили с охлаждёнными растворами, до +40С. Затем гомогенат печени центрифугировали при 9500 г в течение 20 минут. Полученную надосадочную жидкость подвергали дальнейшему центрифугированию при 24000 г в течение 120 минут. Осадок микросом ресу-

спендировали в трис–HCl буфере. В дальнейшем определяли концентрацию белка в микросомах, и полученные микросомы печени использовали для определения продуктов ПОЛ печени и определения антиокислительной активности (АОА) фармакологических агентов, применяемых в эксперименте [7; 55; 123; 124; 490].

### **2.3.5. Метилирование жирных кислот в общих липидах и фракции свободных жирных кислот печени**

Метилирование ЖК ОЛ печени проводилось методом, описанным J.P. Carrelau и J.P. Dubaco [199], с применением металлического Na. Сухой остаток фракции ОЛ печени (50–100 мг) объединяли с 1 мл ароматического растворителя (бензол) и для дальнейшего метилирования липидов с 2 мл 1%-ного р-ра метилата Na с инкубированием на водяной бане при температуре +50°C в течение 40 минут. Добавление в полученную смесь 4 мл 5%-ного раствора ацетохлорида с размещением на водяной бане при температуре +56°C в течение 40 мин приводило к замещению Na на метильную группу по эфирной связи карбоксила. Добавление 10 мл дистиллированной воды, 3 мл гексана и взбалтывание полученной смеси приводило к экстрагированию гексаном липидной фазы с содержанием МЭЖК. После расслоения отбирали гексановый (верхний) слой и упаривали на ротаторном испарителе, в вакууме. Сухой остаток липида взвешивали гравиметрическим методом, добавлялся гексан для создания рабочей концентрации раствора липидов (10%) и производили закол в хроматограф. Метилирование ЖК, фракции СЖК печени производили также с применением металлического Na теми же методическими подходами, что и в ОЛ печени [199; 418].

### **2.3.6. Получение золя кремниевой кислоты**

Для фиксации силикагеля на пластинках ТСХ использовали золь кремниевой кислоты. В получении золя кремневой кислоты 25 мл канцелярского силикатного клея разводили дистиллированной водой до объема 500 мл, раствор пропускали через колонку с 100 см<sup>3</sup> ионообменной смолы КУ 2x8. Смолу в колонке предварительно отмывали от солей железа и переводили в H<sup>+</sup>-форму 5%-ной соляной кислотой, а затем промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод. Кислотность элюата, полученного после пропускания через колонку раствора силикатов, доводили до pH = 7 исходным раствором силикатного клея. Полученный раствор упаривали в 1,5–2 раза при слабом нагреве в течение 2–3 ч [92].

## 2.4. Экспериментальные методы

### 2.4.1. Введение экзогенного ацетилхолина в ткань печени *in situ*

Канюлированием одной из брызжеечных артерий кишечника экспериментальных животных с выходом на портальный венозный синус печени добивались прохождения через сосуды печени раствора, содержащего АХ. Пластиковый сосуд, с помощью которого производили канюлирование одной из брызжеечных артерий кишечника животных, гепаринизировали, на стенку сосуда с введённой канюлей накладывали лигатуру и фиксировали к окружающим мягким тканям. Выход раствора, содержащего АХ, регистрировали через венозный синус правого предсердия миокарда, предварительно синус правого предсердия миокарда канюлировался. Одновременно на гепаринизированную стенку пластиковой трубки и стенку венозного синуса также накладывали лигатуру и производили фиксацию к окружающим мягким тканям.

Для создания эффективного фильтрационного давления проходящего по сосудам печени раствора резервуар с АХ поднимали над операционным столиком. По количеству жидкости, выходящей из венозного синуса правого предсердия миокарда, судили об эффективном фильтрационном давлении, создаваемом в ткани печени. Раствор, кроме АХ, содержал 0,85%-ный NaCl; 0,15 М KCl и 0,05 М раствор пиродифосфата. Температурный режим ткани печени поддерживали размещением на поверхности печени марлевого тампона, периодически смачиваемого в тёплом физиологическом растворе с содержанием 0,15 М KCl в течение 2 ч.

Все животные были разбиты на несколько групп: в группе контроль-1 – ткань печени животных отмывали от крови введением только тёплого физиологического раствора и 0,15 М раствора KCl; в группе контроль-2 – кроме удаления крови из сосудистого русла печени, в течение 2 ч (время подобрано экспериментально) проходил раствор, содержащий 0,85%-ный NaCl; 0,15 М KCl и 0,05 М раствор пиродифосфата. В опытных группах животных к описанному составу раствора добавлялся АХ мольной концентрации от  $1,1 \times 10^{-3}$  М до  $1,1 \times 10^{-6}$  М [120]. После проведенных экспериментов из ткани печени готовили гомогенат (см. препаративные методы).

### 2.4.2. Индуцирование неферментативного (аскорбатзависимого) и ферментативного (NADP•H-зависимого) перекисного (свободно-радикального) окисления липидов в мембранах эндоплазматического ретикула гепатоцитов (микросомы печени) *in vitro*

ПОЛ *in vitro* индуцировали в инкубационной среде, содержащей суспензию микросом печени в присутствии 0,8 мМ аскорбиновой кислоты (в случае неферментативного индуцирования ПОЛ) или 1 мМ NADP•H (в случае

ферментативного индуцирования ПОЛ). Инкубационная среда содержала 50 мМ трис–HCl буфера (рН = 7,4), в присутствии 0,2 мМ пирофосфат натрия и суспензии микросом с содержанием не менее 10 мг белка на 1 мл микросом. ПОЛ при индуцировании неферментативного механизма окисления липидов микросом осуществляли внесением в инкубационную среду раствора  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \times 6 \text{H}_2\text{O}$  (соль Мора) [16; 359].

Индуцирование ферментативного окисления липидов достигалось внесением в инкубационную среду раствора  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  – ферроцианида калия [16; 359]. При этом учитывали при расчётах, что коэффициент мольной экстинкции гексоцианоферрат калия равен  $1,02 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [56].

Конечная концентрация  $\text{Fe}^{2+}$  в случае индуцирования неферментативного механизма и  $\text{Fe}^{3+}$  в случае ферментативного механизма ПОЛ в инкубационной среде должна была составлять 12 мкМ. Продолжительность инкубации в большинстве экспериментов для неферментативного ПОЛ составляла 5 мин при температуре инкубационной среды 37°C и 20 мин при индуцировании ферментативного ПОЛ. Останавливали окисление липидов микросом печени добавлением в инкубационную среду 1 мл 30%-ного раствора ТХУ-содержащего ЭДТА. После окончания инкубации в пробах количественно определяли содержание одного из ТБК-активных продуктов – МДА, по цветной реакции с 2-ТБК [113; 227; 239; 292; 312; 455].

#### **2.4.3. Определение окислительной активности фармакологических агентов неостигмина, пилокарпина, атропина, метацина, никотина, гексаметония in vitro**

Определение окислительной активности (ОА) фармакологических агентов, применяемых в экспериментах, производили *in vitro*, в инкубационной среде. Оценивали способность уменьшать либо увеличивать неферментативное или ферментативное ПОЛ в инкубационной среде, содержащей суспензию микросом печени и фармакологические агенты; изменения выражали в процентах [24; 300; 312].

Инкубационная смесь объёмом 1 мл содержала 0,8 мМ аскорбиновой кислоты, в случае индуцирования неферментативного механизма окисления липидов, или 1 мМ NADP•H в случае активации ферментативного механизма ПОЛ; содержала 0,2 мМ пирофосфата Na, 50 мМ трис–HCl буфера (рН 7,4) и липиды микросом печени из расчёта 10 мг белка в 1 мл микросом. Пробы с окислением липидов микросом, содержащих фармакологические агенты, сравнивали с данными проб, где окислялись только липиды микросом.

Мольная концентрация фармакологических веществ в инкубационной среде создавалась, согласно дозам фармакологических агентов, работающих «*in vivo*». Диапазон мольной концентрации фармакологических веществ в инкубационной среде создавали от  $10^{-6}$  М до  $10^{-3}$  М.

Окислительную активность (ОА) холинотропных фармакологических агентов рассчитывали по формуле [24]:

$$\text{ОА} = \frac{\Delta E \text{ МДА}_{\text{микросомы}} - \Delta E \text{ МДА}_{\text{микросомы}} + \text{фарм агент}}{\Delta E \text{ МДА}_{\text{микросомы}}} \times 100\%.$$

В случае, когда образование МДА в инкубационной среде с фармакологическими агентами превышает содержание МДА проб, где окисляются только липиды микросом печени, делали заключение о увеличении окислительной активности исследуемых фармакологических веществ и отмечалось знаком (-). В случае, если содержание малонового диальдегида в пробах с содержанием фармакологических веществ оказывалось меньше, чем в пробах где происходило окисление только липидов микросом печени, делали заключение о уменьшении окислительной активности исследуемых фармакологических веществ и отмечали знаком (+) [121; 123; 124].

## 2.5. Аналитические методы

### 2.5.1. Диеновая конъюгация общих липидов, фракции свободных жирных кислот печени

После экстрагирования из гомогената печени ОЛ и выпаривания растворителя, ОЛ взвешивали, используя гравиметрический метод, и растворяли в перегнанном этаноле (минимизировали в этаноле присутствие водной фазы). 0,1 мл спиртового раствора липидов вносили в кювету спектрофотометра с предварительно размещённым 2,9 мл объёма этанола. Оптическую плотность содержимого кюветы измеряли при длине волны  $\lambda = 233$  нм, с ходом луча 10 мм [111]. При количественном расчёте ДК использовали коэффициент мольной экстинкции  $- 2,2 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [56]. Величину ДК выражали в нмолях на мг липида.

### 2.5.2. Гидроперекиси общих липидов, фракции свободных жирных кислот печени

Количественно содержание ГП ОЛ определяли по способности к окислению  $\text{Fe}^{2+}$ , содержащейся в соли Мора, и последующей реакцией образовавшегося  $\text{Fe}^{3+}$  с тиоцианатом аммония ( $\text{NH}_4\text{CNS}$ ) [102]. Используя гравиметрический метод, взвешивали ОЛ пробы, затем к 1 мл раствора ОЛ в этаноле приливали 1,7 мл этанола; добавляли 0,2 мл 3%-ного раствора  $\text{HCl}$  на этаноле; 0,1 мл 0,17%-ного раствора  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  (соль Мора) на 3%-ном растворе  $\text{HCl}$  в этаноле; перемешивали и через

30 сек добавляли 0,1 мл 20%-ного водного раствора тиоционата аммония ( $\text{NH}_4\text{CNS}$ ). Оптическую плотность проб измеряли через 15 мин при длине волны  $\lambda = 490$  нм против раствора сравнения, где вместо липидного экстракта содержался 1 мл этанола [66; 103].

С целью пересчёта содержания гидроперекисей липидов в мольные концентрации строили калибровочную кривую для определения ионов  $\text{Fe}^{3+}$  по реакции с тиоционатом аммония ( $\text{NH}_4\text{CNS}$ ), основываясь на том, что ионы  $\text{Fe}^{2+}$  вступают в реакцию с гидроперекисями, находящимися в ОЛ печени, в эквимольных соотношениях [103]. Коэффициент мольной экстинкции образующегося цветного комплекса железа  $[\text{Fe}(\text{CNS})]_6$ , измеряемый при  $\lambda = 490$  нм составляет  $1,1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , а в расчёте на ион  $\text{Fe}^{3+}$   $0,55 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [16; 18; 56].

### 2.5.3. Малоновый диальдегид гомогената печени

2-ТБК вступает в соединение со всеми карбонильными структурами, включая альдегиды сахаров, аминокислот, билирубина, придавая соответствующий спектр поглощения, что создаёт помехи при измерении содержания ТБК-активных продуктов в липидах [312]. При этом совместное нагревание комплекса ТБК-активных продуктов (короткоцепочечные альдегиды) с 2-ТБК может генерировать артефакты окисления липидов за счёт преципитированных остатков белков в пробах [147; 292; 455]. Несмотря на возникновение подобных артефактов, содержание ТБК-активных продуктов (мы считаем, что нами определялось содержание МДА) определяли в водной фазе гомогената печени после центрифугирования и отделения гомогената печени, а также в суспензиях микросом после индуцирования окисления липидов по цветной реакции с 2-ТБК [113; 292; 455].

Так, к 1 мл образца добавляли 1 мл 30%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), перемешивали и центрифугировали. К супернатанту добавляли 1 мл 0,8%-ного раствора 2-тиобарбитуровой кислоты и ставили на кипящую водяную баню на 20 минут. Для предотвращения возгонки водной фазы отверстия пробирок плотно закрывали. После выдерживания температурного режима пробирки охлаждали, в окрашенную фазу добавляли 2-3 капли хлороформа, центрифугировали и верхнюю фазу переносили в кювету с дальнейшим измерением поглощения светового потока при  $\lambda = 532$  нм. Содержание МДА выражали в нмолях на 1 мл приготовленного гомогената печени [113]. При расчётах содержания МДА в пробе использовали коэффициент мольной экстинкции  $1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [16].

Изменения в содержании ДК и ГП ОЛ печени, МДА водной фазы гомогената печени при введении фармакологических агентов, возбуждающих и блокирующих периферические mAChRs и nAChRs ткани печени, зарегистрировано в патенте РФ на изобретение № 2438187 [122].

#### 2.5.4. Белок микросом печени

Содержание общего белка определяли с использованием биуретового реактива в присутствии 0,1%-ного раствора дезоксихолата Na. В качестве стандарта при построении калибровочного графика использовали кристаллический бычий сывороточный альбумин [58].

#### 2.5.5. Катехоламины гомогената печени

В оценке содержания КА гомогената печени [188; 319] применяли метод Лунда, основанный на определении триоксииндолов методом флуориметрии [54]. После осаждения белков гомогената печени фосфорно-вольфрамовой кислотой адсорбирование КА из водной фазы гомогената печени производили гидроксидом алюминия, обработанного по Брокману, с применением колоночного метода адсорбирования [260] и последующим элюированием КА с гидроксидом алюминия 0,25 М раствором уксусной кислоты и размещением элюата в буферных средах с рН = 4,2 и 6,2.

Окисление гексоцианоферритина  $K_3[Fe(CN)_6]$  в опытных пробах способствует образованию оксииндольных форм КА, нахождение которых в инкубационной среде при длинах волн диапазона от  $\lambda = 350$  до  $\lambda = 300$  нм приводит к возникновению флуоресценции адренохромов. Флуоресценция инкубационной среды с рН = 4,2 соответствовала определению адреналина, а в инкубационной среде с рН = 6,2 давала суммарное значение адреналина и норадреналина.

С целью пересчёта содержания триоксииндольных структур КА выстраивали калибровочную кривую с содержанием адреналина и норадреналина в инкубационной среде и по интенсивности флуоресценции образующихся триоксииндольных структур инкубационной среды при рН = 4,2 и рН = 6,2 и диапазоне длин волн от  $\lambda = 350$  до  $\lambda = 300$  нм делали перерасчёт на содержание адреналина и норадреналина ткани печени [78; 142].

#### 2.5.6. Определение молекулярного кислорода гомогената печени

Определение содержания молекулярного кислорода гомогената печени основывается на методе полярографического анализа элементов, находящихся в растворах тканей живых организмов [26; 104]. Поляриметрическое устройство, состоящее из двух электродов и источника постоянного тока, послужило основой для создания изобретения №2348926, с помощью которого производили определение молекулярного кислорода гомогената печени [125].

Процесс регистрации электрического тока, возникающего в ИЭЯ, осуществляли во времени с помощью IBM-системы, имеющей специализированный интерфейс, величина функции времени сохранялась на жестком диске в формате файла, доступного для обработки программой Matlab.

После предварительной балансировки интерфейса, подключённого к ИЭЯ, в инкубационную среду добавлялся 1 мл гомогената печени исследуемых групп животных (приготовление гомогената печени описывали в препаративных методах). Запускался 30-мин эксперимент с процессом регистрации тока в ячейке электролизёра и записью результата эксперимента на жестком диске компьютера (рис. 14).

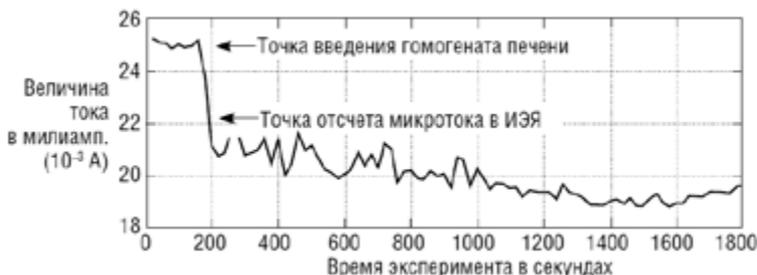


Рис. 14. Запись тока в ячейке электролизёра после добавления гомогената печени

Последующий анализ сохраненной информации осуществляли с помощью математической обработки программой «Matlab», что позволяло обобщать полученные данные в виде цифровых показателей, обозначающих изменение тока гомогената печени (рис. 15).

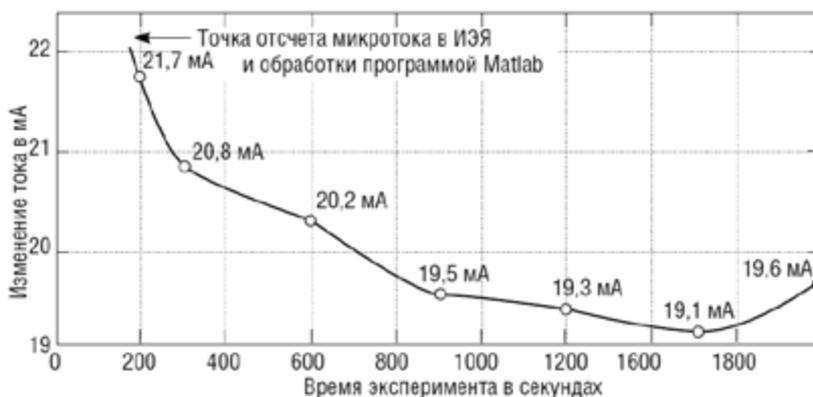


Рис. 15. Цифровые показатели, обозначающие величину тока гомогената печени, после обработки данных программой Matlab

ТФК в биологической среде электронейтральна [403], но обладая дипольным моментом [494] и присутствуя между электродами поляриметра при поданном на них постоянном напряжении, увеличивает поляризуемость молекулы кислорода, что приводит к смещению молекулы кислорода

к одному из электродов поляриметра. Это явление сопровождается увеличением сопротивления, и полученный феномен позволяет отразить зависимость между величиной тока, и изменениями содержания молекулярного кислорода гомогената печени (рис. 16).



Рис. 16. Цифровые показатели, обозначающие содержание кислорода гомогената печени, после обработки данных по току

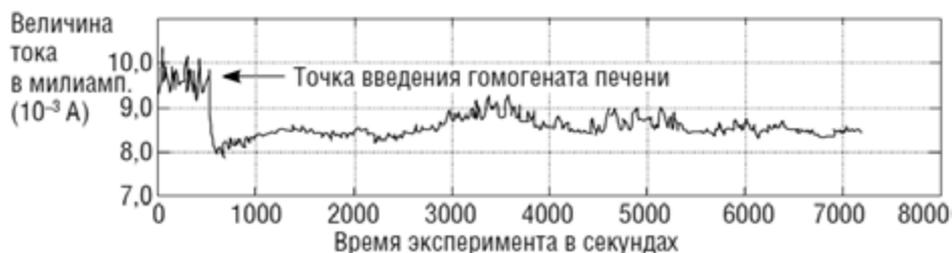
### 2.5.7. Оценка способности гомогената печени продуцировать активные формы кислорода

Акцептирование редокс-потенциала, осуществляемое оксидоредуктазами из органических структур гомогената печени, в том числе и контакт с молекулой кислорода раствора ИЭЯ, ставит гомогенат печени в условия продуцирования АФК [87; 314] у животных, подвергавшихся охлаждению и введению холинотропных фармакологических агентов.

Так, в ИЭЯ помещали 25 мл (100 ЕД) раствора глюкозооксидазы приготовленного на трис-НСI буфере, рН = 5,1. Перед помещением в ИЭЯ гомогената печени с трис-буфером, в соотношении 1 : 100 на электроды подавали напряжение в 2000 мВ (2 В) с выставлением базового тока, равного 10 мА.

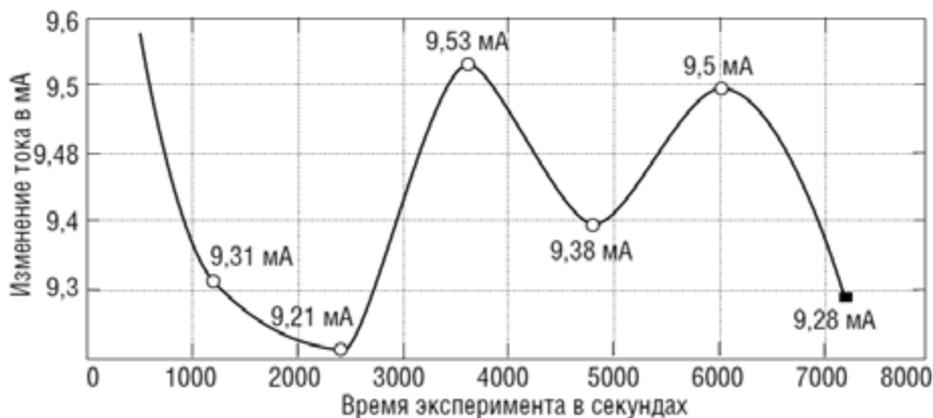
В ИЭЯ добавляли 1 мл раствора, содержащего гомогенат печени (соотношение по объёму – 1 : 2), приготовленного на трис-буфере. Увеличение сопротивления в растворе ИЭЯ приводило к уменьшению величины тока. Через 8–12 мин устанавливался баланс между сопротивлением раствора и величиной тока ИЭЯ, и начиналась регистрация способности гомогената печени продуцировать АФК. Образующиеся АФК гомогената печени формируют вокруг себя электрическое поле с определённой величиной [181]. Изменение этого напряжения укладывается в диапазон от 0 до 2000 милливольт (мВ), и на предложенном приборе был создан алгоритм подачи

изменения напряжения в диапазоне от 0 до 2000 мВ через определённые промежутки времени. Изменение напряжения в числителе, при постоянной константе сопротивления в знаменателе –  $R$  (раствор глюкозооксидазы с гомогенатом печени в ИЭЯ имеет постоянное сопротивление  $R$ ), приводит к изменению величины тока, что нами и регистрировалось с помощью созданного устройства. Подаваемая шкала изменений напряжения на приборе, за определённый промежуток времени сканируя пространство ИЭЯ, определяет изменение поля напряжения АФК, отмечая появление новых АФК гомогената печени, что регистрировали в виде изменений величины тока (рис. 17).



**Рис. 17.** Запись тока в измерительной электролитической ячейке, определяемой как способность гомогената печени интактных животных продуцировать АФК

Математическая обработка записей экспериментов программой «Matlab» позволяло выводить полученные данные в виде цифровых показателей, обозначающих изменение содержания АФК гомогената печени за проведенный период эксперимента (рис. 18 и 19).



**Рис. 18.** Цифровые показатели после обработки данных программой Matlab, обозначающие ток при регистрации активных форм кислорода гомогената печени

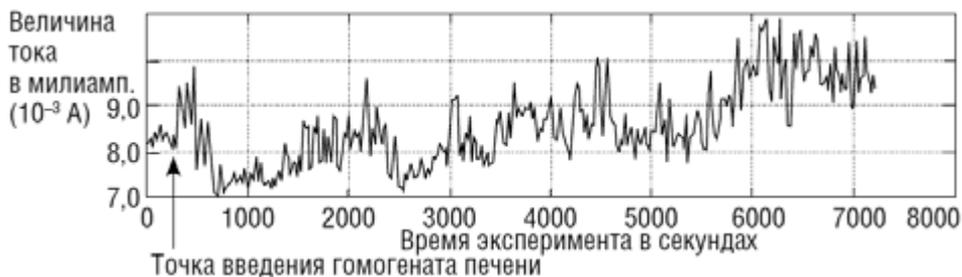


Рис. 19. Запись тока, определяющего способность гомогената печени продуцировать активные формы кислорода, после 5-дневной холодовой нагрузки, создаваемой экспериментальным животным

Обработка оцифрованного сигнала программой «Matlab» также позволяет выносить полученные данные в виде показателей, обозначающих изменение содержания АФК гомогената печени животных, подвергавшихся 5 дням холодовой нагрузки (рис. 20).

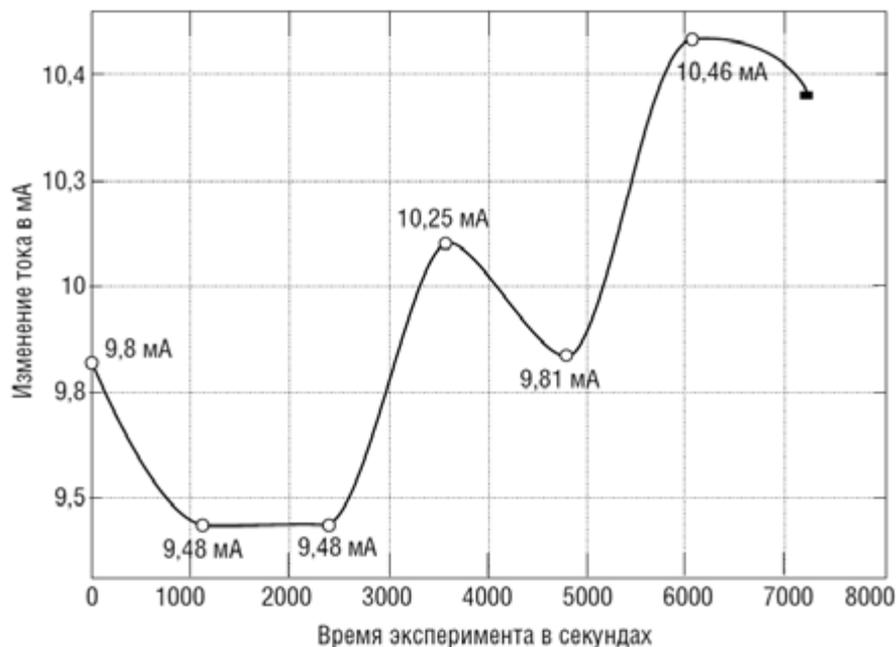


Рис. 20. Содержание активных форм кислорода в гомогенате печени после 5-дневной холодовой нагрузки и обработки программой Matlab

Таким образом, в поляриметрическом устройстве, работающем с раствором оксидоредуктаз, осуществляли регистрацию и расшифровку данных по способности гомогената печени продуцировать АФК.

### 2.5.8. Йодное число общих липидов, фракции свободных жирных кислот печени

Определение йодного числа ОЛ, фракции СЖК печени оценивали расчётным путём по содержанию йода в водной фазе контрольных, опытных проб липидов и титрованием 0,1 М раствором тиосульфата натрия [107]. Титрование химически чистого йода титруемых проб производилось вольт-амперометрическим методом. Критерием прекращения титрования йода являлось возвращение кривой титрования к нулевому потенциалу (рис. 21). Electroдами титруемого раствора служили: графитовый стержень (имеющий нулевой потенциал), а электродом, индуцирующим ЭДС, – платина. Соприкосновение электродов с водной фазой регистрировался в виде пика.



Рис. 21. Регистрация изменений содержания йода вольт-амперометрическим методом титрования

В контрольных пробах добавлялся хлороформ без растворённых липидов, а в опытных пробах – хлороформ растворял исследуемую липидную фазу – фракцию ОЛ печени или фракцию СЖК печени. По разнице йода водной фазы проб (контроль или опыт) определяли величину молекулярно-го йода ОЛ и фракции СЖК печени.

Одновременное присутствие 500 мкл 0,2 М монохлорида и 250 мкл 10% йодистого калия приводило к образованию химически чистого J с площадью пробы контроль  $S_1$  и дальнейший расчёт содержания йода площади  $S_2$ , пробы опыт и расчёте на 1 мг липида выражался формулой:  $\Delta S/\text{мг липида} = 245 \text{ мкмоль J} - (S_1/Y)/\text{мг липида}$ .

### 2.5.9. Содержание 2,3-ДФГ в эритроцитах

Принято считать, что колебания 2,3-ДФГ эритроцитов меняет сродство гемоглобина (Hb) к кислороду [98], с трактовкой его как маркера посту-

пления кислорода в периферическую ткань [90]. В наших исследованиях количественное определение 2,3-ДФГ в эритроцитах было осуществлено неферментативным методом, описанным И.Л. Виноградской и основанном на раздельном определении общего, неорганического фосфора цветной реакцией молибдата аммония [23]. Разница результатов измерения между общим и неорганическим фосфором определяла количество фосфора, принадлежащего 2,3-ДФГ эритроцитов. Фосфаты нуклеотидов предварительно абсорбировались из трихлоруксусного фильтрата эритроцитов древесным углём. Оптическую плотность проб определяли при  $\lambda = 660$  нм.

### **2.5.10. Метилловые эфиры жирных кислот**

Содержание метиловых эфиров (МЭ) монокарбонных (жирных) кислот определяли методом газовой хроматографии с применением колонки ДВ-23 (покрытие 50%-ным цианопропил-метил-полисилоксаном для определения полярных соединений) [194]. Газ-носитель – азот, чистоты 0,9999. При определении МЭЖК применялся ПИД температуры прогрева – 280°C, а испарителя – 270°C. Режим прогрева колонки ДВ-23 подбирали для оптимального режима выхода МЭЖК [365; 401; 416]. Количественные и временные параметры выхода МЭЖК сопоставляли с калибровочными данными эталона МЭЖК 37 Suspelco test mix (USA). Сопоставление и анализ МЭЖК производили с применением программы Хроматэк Аналитик 2,5.

### **2.5.11. Альфа-токоферол общих липидов печени**

Содержание  $\alpha$ -токоферола определяли в ОЛ печени по образованию цветного комплекса реакции дипиридила с  $\text{FeCl}_2$  [57]. К раствору липидов в этаноле добавляли перегнанный этанол до общего объёма 2 мл с последовательным внесением хлороформа, 0,2%-ного раствора дипиридила в этаноле и 0,2%-ного этанольного раствора  $\text{FeCl}_3$ . Измерение экстинкции раствора производили сразу после внесения раствора  $\text{FeCl}_3$ , при  $\lambda = 540$  нм, с ходом луча в 0,5 см. Расчёт поправочного коэффициента (К-фактор) производили на основе tg угла при создании калибровочных кривых по  $\alpha$ -токоферолу. Содержание  $\alpha$ -токоферола выражали в мкг/мг липида.

### **2.5.12. Статистическая обработка полученных результатов**

Статистическая обработка результатов произведена с применением дисперсионного анализа по Крускалу-Уоллису и применением парного критерия Манна – Уитни, это всё входит в концепцию статистической обработки цифрового материала методом ANOVA (ANALYSIS OF VARIATIONS). Статистически значимые результаты считались при  $p < 0,05$  [27; 101].

## Глава 3

# ВЛИЯНИЕ ПРЯМЫХ И НЕПРЯМЫХ ХОЛИНОМИМЕТИКОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОДУКТОВ И СУБСТРАТНЫХ СОСТАВЛЯЮЩИХ ПОЛ ПЕЧЕНИ КРЫС IN VIVO И IN VITRO ПОСЛЕ 3-ЧАСОВОЙ ХОЛОДОВОЙ НАГРУЗКИ

### 3.1. Влияние неостигмина на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ после 3 ч холодной нагрузки

В данных литературы не высказываются сомнения участия холинергических структур плазматической мембраны клетки в формировании процесса ПОЛ, но нет ясности и чёткости направленности ПОЛ. Отмечают, что повышение активности АСhE тканей приводит к увеличению выраженности окислительного стресса [473], и снижение активности АСhE трактуют как увеличение состояния окислительного стресса в биологической системе [357; 437]. При этом К.У. Schallreuter с соавторами считают, что активность АСhE способна менять содержание и перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) в тканях [440].

По данным литературы, содержание PUFA<sub>s</sub> [22; 24; 115; 133; 345], изменения ТФК в тканях биологической системы [127; 314] трактуют как ключевые составляющие формирования ПОЛ. В лаборатории П.П. Денисенко [39; 42; 43] и В.Н. Гурина [29; 30; 31] отмечали изменение содержания СЖК крови при стрессовых состояниях животных, вызванных холодowymi нагрузками и введении фармакологических агентов, возбуждающих либо блокирующих периферические М,Н-холинореактивные структуры плазматических мембран. Сходно с этим, А.И. Кубарко отмечал изменение температуры фазового перехода липидов, вызванных холодной нагрузкой и введением модуляторов холинергического звена [62; 63]. В.И. Тихановым подчеркнута способность моделей центральных и периферических М,Н-холиномиметиков, центральных и периферических М,Н-холинолитиков изменять поглощение кислорода в период формирования холодной адаптации [117].

Ссылки на проведенные исследования создают предпосылки выяснения вопросов влияния холинергических структур плазматической мембраны гепатоцитов на ПОЛ печени.

Исходя из результатов лаборатории А.И. Кубарко, В.Н. Гурина и П.П. Денисенко, а также разнонаправленности литературных данных о влиянии АХ на выраженность окислительного стресса, первым этапом в нашей работе

было выяснение вопроса о влиянии непрямого, периферического М,Н-холиномиметика неостигмина на содержание МЭЖК  $\omega$ -6 (МЭЖК Арахиса) и МЭЖК  $\omega$ -3 (МЭЖК Эйкоза), оценивая при этом способность ЖК (на примере ЖК  $\Delta$  9,12 C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой) трансформироваться из *cis*- в *trans*-изомеры, с определением содержания молекулярного кислорода гомогената печени и содержания 2,3-ДФГ эритроцитов крови.

Оценку МЭЖК, ТФК гомогената печени, оценку содержания 2,3-ДФГ эритроцитов крови производили на фоне определения йодного числа ОЛ, фракции СЖК печени, адреналина и НА гомогената печени после 3 ч холодной нагрузки, создаваемой экспериментальным животным.

Полученные данные сопоставляли с изменением содержания ДК ОЛ, ГП ОЛ печени, ДК и ГП фракции СЖК печени, МДА гомогената печени, оценивали и со способностью неостигмина окислять липиды микросом печени индуцированием ПОЛ ферментативными и неферментными механизмами.

Все параметры, определяемые *in vivo*, снимались после 3-часовой холодной нагрузки в климатокамере. Животным за 30 мин до охлаждения в/бр вводили неостигмин в дозе 0,2 мг/кг. Животным группы контроль-1 и контроль-2, также за 30 мин до начала эксперимента в/бр вводили физиологический раствор в том же объёме, что и животным опытных групп.

Результаты, полученные в эксперименте, представлены ниже, в таблицах 2–18.

Понимая, что в определении феномена окислительного стресса важным вопросом является не только баланс активности прооксидантной и антиоксидантных систем [105], но и содержание КА тканей печени, нами это положение поддерживалось определением содержания адреналина, НА гомогената печени. Так, содержание адреналина ткани печени после 3 ч холодной нагрузки снижалось в 2,3 раза при сравнении с животными группы контроль-1, а содержание НА увеличивалось на 173,7 % (табл. 2).

Введение животным неостигмина на этом фоне охлаждения приводило к росту содержания адреналина ткани печени в 1,5 раза, но снижало выраженность НА на 33%, соответственно.

**Табл. 2.** Влияние неостигмина на содержание адреналина и норадреналина гомогената печени (мкг/мл гомогената) при 3-часовой холодной нагрузке у крыс

Показатели	Адреналин	Норадреналин
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	11,5 [9,8 ÷ 13,1]	32,7 [30,1 ÷ 36,3]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	5,01 [4,1 ÷ 6,2] P <sub>2-1</sub> = 0,0003	89,5 [80,3 ÷ 92,1] P <sub>2-1</sub> = 0,000297
3-ая группа, опыт (холод + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10	7,6 [6,9 ÷ 8,1] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216	59,9 [52,4 ÷ 65,1] P <sub>3-1</sub> = 0,00395 P <sub>3-2</sub> = 0,00216

Таким образом, 3-часовая холодовая нагрузка, создаваемая животным, уменьшала содержание адреналина ткани печени, но увеличивала выраженность НА. Введение на этом фоне охлаждения животных неостигмина способствовало росту адреналина и препятствовало увеличению НА ткани печени.

Рядом авторов отмечено, что показателем готовности липидов к ПОЛ стрессового периода может служить изменение йодного числа [24; 133; 233]. Отмечают, что при СРО ненасыщенных жирнокислотных компонентов липидов не меняется число эфирных связей, но меняется количество двойных связей липидных экстрактов тканей [24]. Безусловно, этот показатель иллюстрирует не только интересующие нас ненасыщенные связи алифатических углеводов – ЖК, но и другие классы липидов – сквален, полициклические ненасыщенные спирты – стерины (холестерин, стероидные гормоны) [85], представляющие для нас возможный интерес в смысле влияния фармакологических веществ холинергической направленности на индуцирование ПОЛ в этих структурах.

Результаты проведенных экспериментов свидетельствовали, что содержание молекулярного йода, как ОЛ, так и фракции СЖК печени животных, подвергавшихся 3-часовой холодовой нагрузке, увеличивалось в 1,2 раза ОЛ и в 1,25 раза фракции СЖК печени, соответственно (табл. 3).

**Табл. 3.** Влияние неостигмина на содержание молекулярного йода общих липидов, фракции свободных жирных кислот печени (йодное число, мкмоль I/мг липида) при 3-часовой холодовой нагрузке у крыс

1-ая группа, контроль-1 (интактные), n =10	2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	3-ья группа, опыт (холод + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10
Общие липиды печени		
4,8 [4,3 ÷ 5,4]	6,1 [5,8 ÷ 6,6] P <sub>2-1</sub> = 0,00216	5,5 [4,7 ÷ 5,8] P <sub>3-1</sub> = 0,000297 P <sub>3-2</sub> = 0,00395
Фракция свободных жирных кислот печени		
161,7 [157,6 ÷ 166,9]	202,3 [190,2 ÷ 233,9] P <sub>2-1</sub> = 0,00216	121,5 [112,3 ÷ 125,8] P <sub>3-1</sub> = 0,000297 P <sub>3-2</sub> = 0,00394

Введение животным неостигмина на фоне 3-часового охлаждения уменьшало содержание молекулярного йода ОЛ печени на 9,8%, а во фракции СЖК на 39,9 %, соответственно.

Подводя итог полученным данным, можно отметить, что 3-часовая холодовая нагрузка, создаваемая животным, увеличивала йодное число ОЛ,

фракции СЖК печени. Введение неостигмина на фоне 3 ч охлаждения животных уменьшало содержание молекулярного йода как ОЛ, так и фракции СЖК.

Формирование теплового баланса биологической системы периода холодовой нагрузки и напряжения периферической стресс-системы обуславливает поступление в кровь из жирового депо липидного материала с обязательным присутствием неэстерифицированных (свободных) и эстерифицированных (в составе триглицеридов и глицерофосфолипидов крови) ЖК [13; 30; 80; 82; 229; 418].

Свободные ЖК (СЖК), в том числе и PUFAs, поступившие в клетку из крови, подвергаются не только  $\beta$ -окислению [213; 214] с дальнейшим разобшением окислительного фосфорилирования [114], но и создают условия для  $\omega$ -окисления ЖК [160] и развития ПОЛ [24; 25; 256]. ЖК, как неэстерифицированные, так и эстерифицированные (в соединении с глицерофосфолипидами мембран клетки) [45; 205; 257; 419], принимая энергетически удобную форму для своих дальнейших окислительных преобразований, могут трансформироваться в состояние trans-изомерии [69; 272; 316; 422].

В наших экспериментах, связанных с ведением животным неостигмина, сделан акцент на определении изменений содержания cis- и trans-изомеров ЖК, на примере ЖК семейства  $\omega 6$  – ЖК  $\Delta 9,12 C_{18:2}$  линолевой, диеновой.

Экспериментально полученные факты свидетельствовали, что холодовая нагрузка (3 ч) приводила к уменьшению в 1,3 раза содержания cis-изомеров ОЛ печени, но увеличивала на 22,2 % выраженность trans-изомеров ЖК, соответственно (табл. 4). Введение же неостигмина приводило к росту как cis-, так и trans-изомеров ЖК на 215,4 % и 34,5%, соответственно.

**Табл. 4.** Влияние неостигмина на содержание cis- и trans-изомеров ЖК  $C_{18:2} \Delta 9,12$  линолевой, диеновой общих липидов печени (мкг/мл гомогената) при 3-часовой холодовой нагрузке у крыс

ЖК семейства $\omega 6$ : $\Delta 9,12 C_{18:2}$ линолевая, диеновая	1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	3-ья группа, опыт (холод + неостигмин 0,2 мг/кг) n=10
cis-изомеры	4725,1 [4216,5 ÷ 4911,8]	3595,5 [3282,1 ÷ 3912,6] $P_{2-1} = 0,00394$	11340,7 [9574,3 ÷ 12114,6] $P_{2-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,000297$
trans-изомеры	13,5 [12,6 ÷ 14,8]	16,5 [15,1 ÷ 18,9] $P_{2-1} = 0,00394$	22,2 [20,6 ÷ 24,1] $P_{3-1} = 0,0003$ $P_{3-2} = 0,00395$

Среди PUFA's печени наиболее активным изменениям подвергались ЖК фракции СЖК – это ЖК семейства  $\omega$ -6 – МЭЖК Арахиса и ЖК семейства  $\omega$ -3 – МЭЖК Эйкоза. Холодовая нагрузка животных периода 3 ч приводила в 1,5 раза к уменьшению содержания МЭЖК Арахиса фракции СЖК печени, но увеличивала в 1,54 раза выраженность МЭЖК Эйкоза, соответственно (табл. 5). Введение неостигмина на этом фоне охлаждения животных увеличивало содержание выше перечисленных МЭ – МЭЖК Эйкоза на 162% и МЭЖК Арахиса на 315 %, соответственно.

**Табл. 5.** Влияние неостигмина на содержание метиловых эфиров жирных кислот:  $\Delta 5,8,11,14 C_{20:4}$  эйкозатетраеновой (МЭЖК Арахиса),  $\Delta 5,8,11,14,17 C_{20:5}$  эйкозапентаеновой (МЭЖК Эйкоза) фракции СЖК печени (мкг/мл гомогената) при 3-часовой холодной нагрузке у крыс

Показатели	МЭЖК $\Delta 5,8,11,14 C_{20:4}$ эйкозатетраеновой (МЭЖК Арахиса)	МЭЖК $\Delta 5,8,11,14,17 C_{20:5}$ эйкозапентаеновой (МЭЖК Эйкоза)
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	6,1 [5,4 ÷ 6,9]	72,1 [65,4 ÷ 86,5]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	4,0 [3,7 ÷ 4,9] $P_{2-1} = 0,00394$	111,7 [100,2 ÷ 146,8] $P_{2-1} = 0,00395$
3-ья группа, опыт (холод + неостигмин 0,2 мг/ кг), n=10	16,6 [15,3 ÷ 18,1] $P_{2-1} = 0,00395$ $P_{3-2} = 0,000297$	293,3 [257,3 ÷ 321,9] $P_{3-1} = 0,0003$ $P_{3-2} = 0,004$

Подводя итог экспериментам по изменению содержания изомеров ЖК ОЛ и изменению PUFA's семейства  $C_{20}$  фракции СЖК, можно отметить, что холодное воздействие, создаваемое животным в течение 3 ч, приводило к росту trans-изомеров ЖК ОЛ печени, но уменьшает содержание МЭЖК Арахиса и увеличивает содержание МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени. Неостигмин вызывал большее увеличение содержания trans-изомеров ЖК ОЛ печени и приводил к увеличению содержания выше перечисленных МЭ – МЭЖК Арахиса и МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени.

Как мы уже отмечали, субстратными составляющими развития ПОЛ является присутствие не только PUFA's семейства  $C_{20}$ , но и ТФК. Определение содержания ТФК гомогената печени, способности гомогената печени продуцировать АФК показало, что холодная нагрузка, создаваемая экспериментальным животным в течение 3 ч, приводила к увеличению содержания ТФК гомогената печени на 5,7%, при этом отмечалось увеличение способности гомогената печени продуцировать АФК в 1,13 раза, соответственно. Введение же на этом фоне охлаждения животным неостигмина уменьшало содержание ТФК на 7,2%, но увеличивало способность гомогената печени продуцировать АФК на 6,1%, соответственно (табл. 6).

**Табл. 6.** Влияние неостигмина на содержание триплетной формы кислорода (мкмоль  $O_2$ /мл гомогената) и способности гомогената печени продуцировать активные формы кислорода ( $10^{-6}$  амп/мл гомогената) при 3-часовой холодовой нагрузке у крыс

Показатели	Триплетная форма кислорода (ТФК)	Активные формы кислорода (АФК)
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n = 10	349,3 [328,6 ÷ 376,7]	8,6 [8,2 ÷ 9,5]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n = 10	369,5 [365,1 ÷ 411,6] $P_{2-1} = 0,00145$	9,8 [9,3 ÷ 10,4] $P_{2-1} = 0,036$
3-ья группа, опыт (холод + неостигмин 0,2 мг/кг), n = 10	343,0 [328,4 ÷ 376,6] $P_{3-1} = 1$ $P_{3-2} = 0,00117$	10,4 [10,1 ÷ 10,6] $P_{3-1} = 0,0001$ $P_{3-2} = 0,0403$

Получение результатов, определяющих содержание ТФК, способности гомогената печени продуцировать АФК, потребовало от нас определения и 2,3-ДФГ эритроцитов крови животных. Следует напомнить, что содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови нами трактуется как маркёр поступления кислорода в исследуемую ткань [14; 90].

Эксперименты показали, что 3-часовая холодовая нагрузка снижала в 1,37 раза содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови, а введение животным неостигмина приводило к более выраженному (на 20,4%) снижению 2,3-ДФГ эритроцитов крови, соответственно (табл. 7).

**Табл. 7.** Влияние неостигмина на содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови (мкмоль Р/мл эритроцитов) при 3-часовой холодовой нагрузке у крыс

Показатели	1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	3-ья группа, опыт (холод + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10
2,3-ДФГ	12,06 [11,2 ÷ 13,6]	8,8 [8,3 ÷ 9,3] $P_{2-1} = 0,00216$	7,01 [5,8 ÷ 7,4] $P_{2-1} = 0,000294$ $P_{3-2} = 0,00395$

Уменьшение содержания 2,3-ДФГ эритроцитов крови после холодовой нагрузки (3 ч) должно демонстрировать уменьшение поступления ТФК в ткань печени, но определение ТФК гомогената печени полярографическим методом свидетельствовали об обратном – об увеличении содержания молекулярного кислорода после данного режима холодовой нагрузки.

Введение же неостигмина периода 3 ч охлаждения животных уменьшало выраженность 2,3-ДФГ эритроцитов крови в большей степени, чем данные групп животных, подвергавшихся только охлаждению (см. табл. 7). В этой части экспериментов данные определения 2,3-ДФГ эритроцитов по направлению совпадают с содержанием ТФК гомогената печени и введении животным неостигмина (см. табл. 6).

Важно подчеркнуть, что накопление эндогенного АХ ткани печени неостигмином на фоне охлаждения животных уменьшает поступление ТФК в ткань печени, но увеличивает способность гомогената тканей продуцировать АФК.

Как мы уже отмечали, данные литературы свидетельствуют о возможности ткани печени продуцировать АФК, что приводит к увеличению вероятности возникновения феномена неспаренной валентности аллильно и бисаллильно расположенных метиленовых групп PUFAs [241; 411]. Изменение содержания ТФК тканевой среды увеличивает возможность возникновения и феномена делокализации двойной связи ненасыщенных компонентов липидов с последующим созданием энергетически удобной формы существования данного участка липида через ДК [119; 410; 411; 442].

Поэтому, определяя содержание ДК ОЛ печени и введении неостигмина при 3-часовой холодовой нагрузке отмечали следующее: предложенный режим охлаждения увеличивал в 1,17 раза выраженность ДК ОЛ печени, введение же неостигмина уменьшало содержание ДК на 20,6% (табл. 8).

**Табл. 8.** Влияние неостигмина на содержание диеновых конъюгатов общих липидов печени (нмоль / мг липида) при 3-часовой холодовой нагрузке у крыс

Показатели	1-ая группа, контроль-1 (интактные), n =10	2-ая группа, контроль-2 (холод), n =10	3-ья группа, опыт (холод + неостигмин 0,2 мг/кг), n =10
Диеновые конъюгаты	143,9 [118,2 ÷ 158,3]	169,0 [159,5 ÷ 181,7] $P_{2-1} = 0,0283$	134,2 [110,2 ÷ 156,9] $P_{3-1} = 0,336$ $P_{3-2} = 0,00353$

Понимая, что формирование ДК и присутствие ТФК ткани печени предопределяет возникновение ПР [426; 442] и понимая, что донатирование водородом ПР происходит с участием водорода жирнокислотных ацилов или  $\alpha$ -токоферола липидной фазы [50; 371; 483], мы определили содержание  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени при охлаждении животных и введении неостигмина. Так, холодовая нагрузка (3 ч) увеличивала в 1,36 раза содержание  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени. Введение же неостигмина на этом фоне охлаждения животных уменьшало выраженность  $\alpha$ -токоферола на 36,8%, соответственно (табл. 9).

Оценивая изменения содержания ГП ОЛ печени, отмечали, что введение животным неостигмина на фоне 3 ч холодовой нагрузки снижало ГП ОЛ печени. Так, если холодовая нагрузка снижала ГП ОЛ печени в 1,22 раза, то в/бр введение неостигмина приводило к более выраженному снижению содержания ГП – на 25,8% при сравнении с животными, подвергшимися только охлаждению (табл. 10).

**Табл. 9.** Влияние неостигмина на содержание  $\alpha$ -токоферола общих липидов печени (мкг/мг липида) при 3-часовой холодовой нагрузке у крыс

Показатели	1-ая группа, контроль-1 (интактные), n =10	2-ая группа, контроль-2 (холод), n =10	3-ья группа, опыт (холод + неостигмин 0,2 мг/кг), n =10
$\alpha$ -Токоферол	3,58 [2,8 ÷ 4,2]	4,9 [4,6 ÷ 5,4] $P_{2-1} = 0,00357$	3,1 [2,86 ÷ 3,41] $P_{3-1} = 0,229$ $P_{3-2} = 0,00264$

**Табл. 10.** Влияние неостигмина на содержание гидроперекисей в общих липидах печени (нмоль /мг липида) при 3-часовой холодовой нагрузке у крыс

Показатели	1-ая группа, контроль-1 (интактные), n =10	2-ая группа, контроль-2 (холод), n =10	3-ья группа, опыт (холод + неостигмин 0,2 мг/кг), n =10
Гидроперекиси	7,4 [6,9 ÷ 8,1]	6,06 [5,1 ÷ 6,8] $P_{2-1} = 0,00394$	4,5 [3,8 ÷ 5,6] $P_{3-1} = 0,0003$ $P_{3-2} = 0,004$

Таким образом, оценивая содержание  $\alpha$ -токоферола ОЛ и ГП ОЛ печени на фоне холодовой нагрузки (3 ч) и введении животным неостигмина, отмечали снижение содержания как  $\alpha$ -токоферола, так и ГП. Увеличение  $\alpha$ -токоферола отмечали только в группе животных, подвергавшихся действию холода (см. табл. 9).

Появление альдегидного кислорода в жирнокислотных цепях липидов [227] и при окислительном  $\beta$ -расщеплении ГП ЖК сопровождается формированием, как мы отмечали в данных литературы, и короткоцепочечных альдегидов [158; 227; 481]. Определение одного из таких альдегидов при введении животным неостигмина показало, что неостигмин при 3-часовом охлаждении увеличивает содержание МДА. Так, если холодовая нагрузка снижает содержание МДА ткани печени в 1,56 раза, то введение неостигмина на данном фоне охлаждения приводит к увеличению МДА на 63,7%, соответственно (табл. 11).

**Табл. 11.** Влияние неостигмина на содержание малонового диальдегида ткани печени (нмоль/мл гомогената) при 3-часовой холодовой нагрузке у крыс

Показатели	1-ая группа, контроль-1 (интактные), n =10	2-ая группа, контроль-2 (холод), n =10	3-ья группа, опыт (холод + неостигмин 0,2 мг/кг), n =10
Малоновый диальдегид (МДА)	1,42 [1,28 ÷ 1,62]	0,907 [0,716 ÷ 1,2] $P_{2-1} = 0,0283$	1,485 [1,296 ÷ 1,92] $P_{3-1} = 0,378$ $P_{3-2} = 0,00388$

Суммируя данные введения животным неостигмина на фоне 3-часовой холодовой нагрузки, можно отметить следующее. Охлаждение животных влияет на условия, способствующие формированию ПОЛ – отмечается снижение содержания адреналина, но увеличивается выраженность НА. Введение неостигмина способствовало росту содержания адреналина, но препятствовало увеличению НА. Холодовая нагрузка (3 ч) увеличивала поступление молекулярного йода в ОЛ, во фракцию СЖК печени, а неостигмин уменьшал йодное число ОЛ, фракции СЖК печени. В период 3-часовой холодовой нагрузки отмечали количественный рост *trans*-изомеров ЖК, определяемых в ОЛ (на примере ЖК Δ<sup>9</sup>,<sup>12</sup> C<sub>18,2</sub> линолевой, диеновой) печени, но уменьшалось содержание МЭЖК Арахиса и увеличивалась выраженность МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени. Неостигмин и предложенный режим охлаждения животных приводил к увеличению содержания *trans*-изомеров ЖК ОЛ печени, способствовал увеличению содержания МЭЖК Эйкоза и в большей степени, чем МЭЖК Арахиса, фракции СЖК печени.

Охлаждение животных в течение 3 ч увеличивало содержание ТФК ткани печени и повышало уровень 2,3-ДФГ эритроцитов крови, тем самым демонстрируя увеличенную способность ткани печени к продуцированию АФК на холоде.

Неостигмин уменьшал выраженность ТФК ткани печени, снижал содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови, но способность гомогената печени продуцировать АФК увеличивал.

Определяя содержание ДК ОЛ печени, отмечали, что 3-часовая холодовая нагрузка увеличивала выраженность ДК, введение же неостигмина снижало этот показатель. Важно подчеркнуть, что неостигмин и 3-часовой холод уменьшает йодное число ОЛ печени и отмечается уменьшение выраженности ДК ОЛ печени. Определяя содержание α-токоферола ОЛ печени отмечали, что если 3-часовая холодовая нагрузка увеличивала содержание α-токоферола ОЛ печени, то неостигмин уменьшал её.

Холод в течение 3 ч уменьшал содержание ГП ОЛ печени, введение же неостигмина способствовало в большей степени уменьшению содержания ГП ОЛ печени. Содержание МДА после 3-часовой холодовой нагрузки ткани печени было сниженным. Введение неостигмина на фоне данного режима охлаждения животных приводило к росту МДА ткани печени.

Таким образом, обобщая полученные данные, можно подвести итог: введение неостигмина на фоне 3 ч холода увеличивало содержание адреналина в ткани печени; неостигмин увеличивал переход из *cis*- в *trans*-изомеры ЖК ОЛ; увеличивал выраженность МЭЖК Арахиса и МЭЖК Эйкоза фракции СЖК и при этом отмечали увеличение способности гомогената печени продуцировать АФК.

Необходимо, на наш взгляд, сделать акцент на следующем. Если на фоне 3-часовой холодовой нагрузки отмечали увеличение содержания ДК ОЛ печени с уменьшением ГП ОЛ и МДА ткани печени, то введение животным не-

остигмина увеличивало выраженность МДА на фоне снижения содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени и снижения содержания  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени.

В ходе работы были высказаны предположения о возможном влиянии химических элементов структуры неостигмина на формирование продуктов ПОЛ печени. Оставался нерешённым вопрос о возможной способности химических элементов в структуре неостигмина и влиянии редокс-цепей ткани печени индуцировать переменную валентность и тем самым оказывать влияние на формирование СРО печени, поэтому выяснению данного вопроса и посвящён следующий раздел работы.

### **3.2. Результаты ПОЛ, полученные *in vitro* индуцированием неферментативных или ферментативных механизмов окисления липидов микросом печени в присутствии неостигмина**

Анализ данных введения животным неостигмина на фоне 3-часовой холодовой нагрузки и сопоставление данных литературы убеждают нас в способности неостигмина, накапливающего антихолинэстеразными механизмами эндогенный АХ, создавать условия, изменяющие, смещающие окислительную трансформацию продуктов ПОЛ печени, и влиять на содержание субстратных составляющих ПОЛ, влиять на условия, способствующие изменению ПОЛ печени.

Так, результатом проведенных исследований были отмечены изменения содержания адреналина, НА ткани печени, отмечали способность перехода ЖК из *cis*- в *trans*-изомеры (на примере ЖК  $\Delta$  9,12 C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой), отмечали количественные изменения содержания и субстратов обеспечивающих ПОЛ – МЭЖК Арахиса и МЭЖК Эйкоза фракции СЖК, отмечали изменения содержания ТФК гомогената печени, способности гомогената печени продуцировать АФК, но влияние неостигмина на величину ДК, ГП и МДА через холинергические механизмы плазматических мембран вызывало сомнения [24; 89]. Причиной сомнения послужили данные присутствия диметилкарбомойльной, оксифенольной и триметиламмонийной составляющих молекулы неостигмина [79].

Высказывались предположения, что химические элементы (гетероатомы) структуры неостигмина способны выполнять функцию донора или акцептора редуцирующих эквивалентов при индуцировании ПОЛ тканей печени и тем самым создавать условия возникновения феномена переменной валентности в структуре неостигмина, влияя на ПОЛ печени и подталкивая переход продуктов ПОЛ [123]. Как вариант высказываемой гипотезы предполагалось и противоположное – эндогенный АХ, накапливаемый неостигином, создаёт условия окисления липидов печени через холинергические механизмы плазматических мембран гепатоцитов.

Для опровержения или подтверждения высказанных предположений были проведены эксперименты индуцирования ПОЛ *in vitro* в присутствии неостигмина в инкубационной среде. Полученные данные сопоставляли с результатами экспериментов, проведенных *in vivo*. Так, окисление липидов *in vitro* и присутствие неостигмина в инкубационной среде мольной концентрации  $10^{-4}$  М (данная мольная концентрация неостигмина соответствует дозе неостигмина, вводимого животным – 0,2 мг/кг) показывало, что окисление липидов микросом печени, индуцированное неферментативными механизмами, вызывало уменьшение окисления липидов, оцененное в 5,5% (табл. 12).

**Табл. 12.** Влияние неостигмина ( $10^{-4}$  М) на неферментативное (аскорбатзависимое) окисление липидов микросом печени крыс (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Содержание малонового диальдегида в пробах до окисления липидов микросом		Содержание малонового диальдегида в пробах после окисления липидов микросом		Окислительная активность
1-ая группа проб ΔЕмда микросом, n = 10	2-ая группа проб ΔЕмда микросом + неостигмин, n = 10	3-ья группа проб ΔЕмда микросом, n = 10	4-ая группа проб ΔЕмда микросом + неостигмин, n = 10	Окислительные эффекты неостигмина
0,304 [0,218÷0,411]	0,503 [0,407 ÷ 0,561] P <sub>2-1</sub> = 0,00648	19,1 [18,4 ÷ 19,6] P <sub>3-1</sub> = 0,0001 P <sub>3-2</sub> = 0,0172	18,05 [17,7 ÷ 18,4] P <sub>4-1</sub> = 0,00225 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,004	+5,5% [+2,94 ÷ +7,35]

Примечание: здесь и далее в таблицах (+) означает уменьшение окислительного эффекта; (-) – увеличение окислительного эффекта.

**Табл. 13.** Влияние неостигмина ( $10^{-4}$  М) на ферментативное (NADP•Н-зависимое) окисление липидов микросом печени крыс (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Содержание малонового диальдегида в пробах до окисления липидов микросом		Содержание малонового диальдегида в пробах после окисления липидов микросом		Окислительная активность
1-ая группа проб ΔЕмда микросом, n = 10	2-ая группа проб ΔЕмда микросом + неостигмин, n = 10	3-ья группа проб ΔЕмда микросом, n = 10	4-ая группа проб ΔЕмда микросом + неостигмин, n = 10	Окислительные эффекты неостигмина
0,147 [0,116 ÷ 0,248]	0,436 [0,193÷0,772] P <sub>2-1</sub> = 0,0163	2,378 [2,125÷2,566] P <sub>3-1</sub> = 0,0172 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	2,818 [2,428 ÷ 2,953] P <sub>4-1</sub> = 0,000224 P <sub>4-2</sub> = 0,004 P <sub>4-3</sub> = 0,0249	-3,4% [15,6 ÷ - 0,1]

Индукция же окисления липидов ферментативными механизмами с присутствием неостигмина в инкубационной среде мольной концентрации  $10^{-4}$  М вызывало усиление окисления липидов микросом печени, оцененное в 3,4% (табл. 13).

Таким образом, окисление липидов микросом печени *in vitro* и присутствии неостигмина в инкубационной среде мольной концентрации  $10^{-4}$  М индукцией неферментативного механизма окисления способствовало уменьшению окисления, модулирование же ферментативного механизма окисления липидов в присутствии неостигмина вызывало противоположный эффект – усиление окисления.

Сопоставляя данные экспериментов, индуцирующих ПОЛ печени *in vitro* неферментативными механизмами, с данными *in vivo*, можно сделать следующее заключение. Присутствие неостигмина тканевой среды печени с входящими диметилкарбамонильной, оксифенольной и триметиламмонийной составляющими в дозах, применяемых в эксперименте, не способствует увеличению ПОЛ печени. Безусловно, оговаривая условие, что во главе окисления липидов печени доминируют неферментативные механизмы ПОЛ.

Сопоставление же данных окисления липидов печени, полученных *in vivo*, с данными окисления липидов микросом печени *in vitro* и индукции ферментативного механизма ПОЛ предполагало следующее. Присутствие неостигмина и активация ПОЛ ферментативными механизмами может усилить окисление липидов. Но подобное заключение не сбрасывает со счетов возможность окисления липидов печени и через холинергические механизмы плазматической мембраны клеток. В связи с такими предположениями возник вопрос о влиянии АХ на ПОЛ печени. Выяснению данного вопроса и был посвящён следующий этап нашей работы.

### **3.3. Влияние ацетилхолина ткани печени на содержание продуктов ПОЛ и субстратных составляющих ПОЛ печени**

На основании данных предыдущих разделов работы было сделано заключение, что непрямой холиномиметик неостигмин, одновременно возбуждающий мускариновчувствительные ацетилхолиновые зоны (рецепторы) метаботропных G-белков [53; 153; 154; 302; 496] и никотиновчувствительные ацетилхолиновые участки лиганд-проводящих ионных каналов [210; 377] плазматической мембраны гепатоцитов эндогенным АХ, приводит к ускорению формирования одного из короткоцепочечных альдегидов – МДА, и происходит это на фоне уменьшения содержания ДК ОЛ, ГП ОЛ печени.

Введение животным неостигмина периода 3-часовой холодовой нагрузки способствовало изменению не только йодного числа ОЛ, фракции СЖК печени, но и количественно изменяло содержание *trans*-изомеров ЖК (на

примере ЖК  $\Delta$  9,12 C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой). При этом отмечали способность гомогената печени экспериментальных животных увеличивать продукцию АФК, увеличивать содержание адреналина и увеличивать выраженность МЭЖК Арахидонооксидазы, МЭЖК Эйкоксилиазы (трактуемых как субстратные составляющие ПОЛ печени), отмечали изменение и в содержании  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени.

Результаты экспериментов, проведенные *in vitro*, с добавлением неостигмина в инкубационную среду показали, что присутствие неостигмина и индукция ферментативного механизма окисления липидов микросом печени уменьшало окисление липидов. Активация же ферментативного механизма окисления липидов способствовала усилению окисления липидов микросом печени.

Сопоставление результатов экспериментов, полученных *in vivo* и *in vitro* с добавлением неостигмина, заставило нас высказать предположения, что изменения содержания продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ и изменение условий, способствующих развитию ПОЛ печени, – это эффекты, вызываемые активацией мускариночувствительных ацетилхолиновых участков (рецепторов) метаболитных G-белков и никотиночувствительных структур лиганд-проводящих ацетилхолиновых участков ионных каналов плазматической мембраны гепатоцитов эндогенным АХ, возникших, как результат введения неостигмина. В связи с таким предположением были проведены эксперименты, связанные с введением АХ в ткань печени *in situ*.

Результаты экспериментов свидетельствовали, что происходили изменения содержания ДК ОЛ, ГП ОЛ печени и МДА ткани печени после прохождения АХ по сосудистому руслу ткани печени. Так, АХ мольной концентрации  $1,1 \times 10^{-3}$  М увеличивал выраженность ДК ОЛ печени и сравнении группы животных контроль-2 на 7,7%. Мольная концентрация АХ  $1,1 \times 10^{-4}$  М в сосудистом русле ткани печени не вызывала увеличение содержания ДК. Полученная величина определялась на уровне группы животных контроль-2, а в концентрации  $1,1 \times 10^{-5}$  М и  $1,1 \times 10^{-6}$  М АХ достоверно снижал содержание ДК ОЛ на 9,7% и 25,5%, соответственно (табл. 14).

**Табл. 14.** Влияние ацетилхолина  $1,1 \times 10^{-3}$  М –  $1,1 \times 10^{-6}$  М при введении в печень *in situ* на содержание диеновых конъюгатов общих липидов печени крыс (нмоль/мг липида)

Группа 1 Контроль-1 (интактные), n=10	303,6 [298,3 ÷ 310,1]
Группа 2 Контроль-2 (0,85 % NaCl + 0,15 М KCl + 0,05 М пиродифосфата), n = 10	285,4 [275,4 ÷ 294,6] P <sub>2-1</sub> = 0,0027
Группа 3 Ацетилхолин $1,1 \times 10^{-3}$ М, n=10	307,5 [298,0 ÷ 314,0] P <sub>3-1</sub> = 0,332 P <sub>3-2</sub> = 0,0011

Группа 4 Ацетилхолин $1,1 \times 10^{-4}$ М, n=10	282,5 [270,3 ÷ 293,9] $P_{4-1} = 0,00547$ $P_{4-2} = 0,0641$ $P_{4-3} = 0,000252$
Группа 5 Ацетилхолин $1,1 \times 10^{-5}$ М, n=10	257,9 [249,8 ÷ 266,5] $P_{5-1} = 0,000237$ $P_{5-2} = 0,00119$ $P_{5-3} = 0,0427$ $P_{5-4} = 0,000778$
Группа 6 Ацетилхолин $1,1 \times 10^{-6}$ М, n=10	212,8 [193,7 ÷ 231,8] $P_{6-1} = 0,798$ $P_{6-2} = 0,000583$ $P_{6-3} = 0,907$ $P_{6-4} = 0,00113$ $P_{6-5} = 0,000778$

Таким образом, АХ мольной концентрации  $1,1 \times 10^{-3}$  М ткани печени, вводимый *in situ*, способствовал увеличению содержания ДК ОЛ печени, а АХ мольной концентрации  $1,1 \times 10^{-5}$  М;  $1,1 \times 10^{-6}$  М приводил к снижению содержания ДК ОЛ печени.

Данные литературы утверждают, что основными субстратами с оптимальным числом и конфигурацией двойных связей обеспечивающих ПОЛ тканей являются ЖК числа углеродных атомов  $C_{20}$  [24; 115; 276; 410]. Результаты наших исследований показали, что АХ в концентрации  $1,1 \times 10^{-3}$  М вызывал увеличение содержания МЭЖК Арахис ОЛ в 1,29 раза и МЭЖК Эйкоза ОЛ в 1,21 раза в сравнении с данными группы животных контроль-2, соответственно (табл. 15).

**Табл. 15.** Влияние ацетилхолина  $1,1 \times 10^{-3}$  М –  $1,1 \times 10^{-6}$  М при введении в печень *in situ* на содержание метиловых эфиров жирных кислот  $\Delta 5,8,11,14 C_{20:4}$  эйкозатетраеновой и  $\Delta 5,8,11,14.17 C_{20:5}$  эйкозапентаеновой общих липидов печени крыс (мкг/мл гомогената)

Показатели	МЭЖК $C_{20:4}$ $\Delta 5,8,11,14$ эйкозатетраеновой (Арахис)	МЭЖК $C_{20:5}$ $\Delta 5,8,11,14.17$ эйкозапентаеновой (Эйкоза)
Группа 1 Контроль-1 (интактные), n=10	6,7 [6,05 ÷ 7,1]	70,5 [68,1 ÷ 76,2]
Группа 2 Контроль-2 (0,85 % NaCl + 0,15 М KCl + 0,05 М пиро- фосфата), n = 10	5,4 [4,9 ÷ 5,9] $P_{2-1} = 0,00395$	81,5 [78,2 ÷ 86,6] $P_{2-1} = 0,00216$
Группа 3 Ацетилхолин $1,1 \times 10^{-3}$ М, n=10	7,0 [6,8 ÷ 7,2] $P_{3-1} = 0,0373$ $P_{3-2} = 0,000874$	99,3 [90,1 ÷ 112,6] $P_{3-1} = 0,0003$ $P_{3-2} = 0,00394$

Группа 4 Ацетилхолин $1,1 \times 10^{-4}$ М, n=10	4,7 [4,5 ÷ 5,0] $P_{4-1} = 0,00037$ $P_{4-2} = 0,00432$ $P_{4-3} = 0,00216$	81,0 [78,0 ÷ 86,5] $P_{4-1} = 0,00216$ $P_{4-2} = 0,936$ $P_{4-3} = 0,00394$
Группа 5 Ацетилхолин $1,1 \times 10^{-5}$ М, n=10	4,14 [3,7 ÷ 4,4] $P_{5-1} = 0,00216$ $P_{5-2} = 0,00394$ $P_{5-3} = 0,004$ $P_{5-4} = 0,00395$	73,0 [69,2 ÷ 75,1] $P_{5-1} = 0,521$ $P_{5-2} = 0,004$ $P_{5-3} = 0,00394$ $P_{5-4} = 0,00216$
Группа 6 Ацетилхолин $1,1 \times 10^{-6}$ М, n=10	3,3 [2,9 ÷ 3,5] $P_{6-1} = 0,00216$ $P_{6-2} = 0,004$ $P_{6-3} = 0,00394$ $P_{6-4} = 0,0034$ $P_{6-5} = 0,004$	65,3 [61,1 ÷ 68,1] $P_{6-1} = 0,0216$ $P_{6-2} = 0,000397$ $P_{6-3} = 0,0197$ $P_{6-4} = 0,0333$ $P_{6-5} = 0,00394$

Уменьшение мольной концентрации АХ в сосудистом русле ткани печени сопровождалось снижением содержания МЭЖК Арахиса и МЭЖК Эйкоза ОЛ печени. Так, прохождение АХ мольной концентрации  $1,1 \times 10^{-4}$  М по сосудистому руслу ткани печени приводило к снижению МЭЖК Арахиса ОЛ на 15,3 % и в определении МЭЖК Эйкоза ОЛ отмечалось статистически недостоверное снижение. При прохождении АХ мольной концентрации  $1,1 \times 10^{-5}$  М и  $1,1 \times 10^{-6}$  М отмечали снижение МЭЖК Арахиса ОЛ на 23,4% и 38,9%, а при определении МЭЖК Эйкоза ОЛ – на 10,5% и 18,8%, соответственно.

Сопоставление и анализ данных экспериментов, связанных с изменением содержания ДК ОЛ и МЭЖК ОЛ печени, позволяет сделать следующие обобщения: АХ мольной концентрации  $1,1 \times 10^{-3}$  М увеличивает содержание как ДК ОЛ, так и МЭЖК Арахиса и МЭЖК Эйкоза ОЛ печени (см. табл. 14 и 15). Уменьшение мольной концентрации АХ ( $1,1 \times 10^{-5}$  М;  $1,1 \times 10^{-6}$  М) раствора, проходящего через ткань печени, сопровождается уменьшением содержания как ДК ОЛ, так и МЭЖК Арахиса ОЛ, МЭЖК Эйкоза ОЛ ткани печени.

Полученные данные могут служить основанием для высказывания предположения, что присутствие АХ в тканевой среде печени, возможно, предопределяет его участие в формировании ДК липидов печени, это же положение можно отнести и к количественному изменению содержания МЭЖК семейства  $\omega$ -6 – МЭЖК Арахиса ОЛ и МЭЖК семейства  $\omega$ -3 – МЭЖК Эйкоза ОЛ печени. Понимая, что одновременно с ДК и присутствии ТФК тканей формируется ПР [411; 442] с образованием ГП, то в проведенных сериях экспериментов определяли одновременно содержание  $\alpha$ -токоферола и ГП ОЛ печени. АХ ткани печени снижал содержания  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени. Но оценивая содержание ГП ОЛ печени, получали данные, свидетельствующие о противоположном: прохождение АХ по сосудистому руслу ткани печени за исключением АХ мольной концентрации  $1,1 \times 10^{-4}$  М приводило к увеличению содержания ГП ОЛ (табл. 16).

**Табл. 16.** Влияние ацетилхолина  $1,1 \times 10^{-3}$  М –  $1,1 \times 10^{-6}$  М при введении в печень *in situ* на содержание  $\alpha$ -токоферола (мкг/мг липида), гидроперекисей жирных кислот общих липидов печени (нмоль/мг липида) и малонового диальдегида (нмоль/мл гомогената) в печени крыс

Показатели	$\alpha$ -Токоферол	Гидроперекиси	Малоновый диальдегид
Группа 1 Контроль-1 (интактные), n = 10	5,64 [4,96 ÷ 5,87]	17,9 [16,7 ÷ 19,2]	3,45 [2,86 ÷ 4,6]
Группа 2 Контроль-2 (0,85 % NaCl + 0,15 М KCl + 0,05 М пиродифосфата), n = 10	4,32 [4,01 ÷ 4,82] $P_{2-1} = 0,00394$	11,1 [9,7 ÷ 12,6] $P_{2-1} = 0,0161$	6,32 [5,58 ÷ 6,79] $P_{2-1} = 0,00394$
Группа 3 Ацетилхолин $1,1 \times 10^{-3}$ М, n = 10	3,77 [3,45 ÷ 3,95] $P_{3-1} = 0,000297$ $P_{3-2} = 0,00216$	17,9 [16,8 ÷ 21,3] $P_{3-1} = 0,688$ $P_{3-2} = 0,00674$	6,78 [6,35 ÷ 7,04] $P_{3-1} = 0,00119$ $P_{3-2} = 0,065$
Группа 4 Ацетилхолин $1,1 \times 10^{-4}$ М, n = 10	3,11 [2,99 ÷ 3,41] $P_{4-1} = 0,0001$ $P_{4-2} = 0,0197$ $P_{4-3} = 0,00394$	10,6 [9,6 ÷ 12,3] $P_{4-1} = 0,00426$ $P_{4-2} = 0,423$ $P_{4-3} = 0,00426$	15,29 [13,84 ÷ 16,87] $P_{4-1} = 0,004$ $P_{4-2} = 0,00119$ $P_{4-3} = 0,00395$
Группа 5 Ацетилхолин $1,1 \times 10^{-5}$ М, n = 10	2,8 [2,6 ÷ 2,9] $P_{5-1} = 0,004$ $P_{5-2} = 0,00397$ $P_{5-3} = 0,00216$ $P_{5-4} = 0,00394$	25,4 [23,8 ÷ 27,4] $P_{5-1} = 0,00395$ $P_{5-2} = 0,003$ $P_{5-3} = 0,00394$ $P_{5-4} = 0,000297$	5,71 [4,85 ÷ 6,67] $P_{5-1} = 0,00395$ $P_{5-2} = 0,149$ $P_{5-3} = 0,0131$ $P_{5-4} = 0,00394$
Группа 6 Ацетилхолин $1,1 \times 10^{-6}$ М, n = 10	2,39 [2,18 ÷ 2,65] $P_{6-1} = 0,00216$ $P_{6-2} = 0,00394$ $P_{6-3} = 0,004$ $P_{6-4} = 0,00216$ $P_{6-5} = 0,004$	17,0 [15,3 ÷ 19,8] $P_{6-1} = 0,336$ $P_{6-2} = 0,00395$ $P_{6-3} = 0,2$ $P_{6-4} = 0,00394$ $P_{6-5} = 0,00216$	8,07 [7,52 ÷ 8,25] $P_{6-1} = 0,00394$ $P_{6-2} = 0,004$ $P_{6-3} = 0,00395$ $P_{6-4} = 0,004$ $P_{6-5} = 0,00494$

Определяя короткоцепочечный альдегид ПОЛ – МДА, отмечали, что экзогенно вводимый в ткань печени АХ мольной концентрации  $1,1 \times 10^{-3}$  М;  $1,1 \times 10^{-4}$  М и  $1,1 \times 10^{-6}$  М приводил к увеличению содержания МДА ткани печени. Мольная концентрация АХ  $1,1 \times 10^{-5}$  М не вызывала повышение МДА, но в данной группе животных отмечали повышение ГП ОЛ в 2,28 раза в сравнении с результатами группы животных контроль-2, соответственно.

Таким образом, АХ ткани печени и снижение мольной концентрации раствора уменьшает содержание ДК ОЛ, МЭЖК Арахис ОЛ и МЭЖК Эйкоза ОЛ. Отмечается снижение содержания и  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени, но при этом регистрируется повышение уровня ГП ОЛ печени, происходит увеличение содержания и МДА ткани печени.

Сопоставляя данные содержания ДК ОЛ, ГП ОЛ печени, содержание МДА ткани печени и прохождении АХ в сосудистом русле печени с данными введения животным неостигмина периода 3 ч холода, можно отметить следующее: 3-часовая холодовая нагрузка приводила к росту ДК ОЛ, но на фоне снижения содержания ГП ОЛ и МДА ткани печени. Введение же неостигмина сопровождалось ростом содержания МДА, но на фоне снижения ДК ОЛ и ГП ОЛ печени. АХ сосудистого русла ткани печени увеличивал выраженность как МДА, так и ГП ОЛ, но на фоне снижения ДК ОЛ.

Мы считаем, что полученные данные свидетельствуют о том, что происходит не только увеличение содержания, но и увеличение окислительной трансформации продуктов ПОЛ – ускорение перехода одного вида продукта ПОЛ печени в другой. Следовательно, можно отметить совпадение по направлению изменения в содержании продуктов ПОЛ печени и введении животным на фоне охлаждения фармакологического агента, накапливающего антихолинэстеразными механизмами эндогенный АХ, и изменениями в содержании продуктов ПОЛ печени при прохождении АХ по сосудистому руслу ткани печени.

Косвенными подтверждениями данной направленности могут служить результаты об изменении содержания МЭЖК Арахис ОЛ и МЭЖК Эйкоза ОЛ печени, полученные *in situ*, – с уменьшением мольной концентрации АХ сосудистого русла печени выраженность МЭЖК Арахис и МЭЖК Эйкоза ОЛ печени уменьшается. Отмечается уменьшение содержания и  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени.

Атом азота неподелённой электронной пары, присутствие сложной эфирной связи карбонильной части молекулы АХ [48] оставляет открытым для нас вопрос о возможном индуцировании переменной валентности в химических элементах (атом азота, атомы кислорода) структуры АХ, что и предрасполагает к возникновению феномена одноэлектронного окисления, восстановления липидов [124]. Для ответа на этот вопрос нами индуцировалось ПОЛ ферментативными и неферментативными механизмами *in vitro* с присутствием в инкубационной среде АХ такой мольной концентрации, которая соответствует мольной концентрации АХ сосудистого русла ткани печени.

### **3.4. Индуцирование ПОЛ микросом печени *in vitro* в присутствии ацетилхолина**

В предыдущих экспериментах, посвящённых окислительным эффектам непрямого холиномиметика неостигмина *in vivo*, были показаны результаты, свидетельствующие, что на фоне 3-часовой холодовой нагрузки и введения животным неостигмина отмечается увеличение содержания и смещение окислительной трансформации продуктов ПОЛ в сторону увеличения продуктов ПОЛ, содержащих альдегидный кислород. Так, отмечали рост содержания МДА ткани печени на фоне снижения содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени. Данные *in vitro* показали, что активация ферментных

механизмов и присутствии неостигмина в инкубационной среде увеличивало способность липидов микросом печени к ПОЛ, индуцирование же неферментативных механизмов приводило к противоположному эффекту – к уменьшению окисления липидов микросом печени.

Такая разнонаправленность эффектов окисления липидов, возникающая в присутствии неостигмина *in vivo* и *in vitro*, поставила перед нами задачу оценить эффекты АХ, возникающие введением его в ткань печени и сопоставить с окислением АХ *in vitro* в присутствии липидов микросом печени. Поэтому, влиянию АХ на окисление липидов микросом печени *in vitro* и индуцировании ПОЛ ферментативными, неферментативными механизмами и был посвящён очередной раздел работы.

Нами были получены следующие результаты. Присутствие АХ в инкубационной среде и индуцировании ПОЛ микросом печени как ферментативным, так и неферментативным механизмами вызывало уменьшение окисления липидов микросом печени (табл. 17 и 18).

АХ в предложенных мольных концентрациях ( $10^{-3}$  М;  $10^{-4}$  М;  $10^{-5}$  М;  $10^{-6}$  М) и индуцирование неферментативных, ферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* приводило к уменьшению способности липидов микросом печени к окислению.

**Табл. 17.** Влияние ацетилхолина  $1,1 \times 10^{-3}$  М –  $1,1 \times 10^{-6}$  М на неферментативное (аскорбатзависимое) окисление липидов микросом печени крыс (содержание малонового диальдегида, нмоль /мг белка)

Мольная концентрация ацетилхолина инкубационной среды		$10^{-3}$ М	$10^{-4}$ М	$10^{-5}$ М	$10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб $\Delta E_{MDA}$ микросом, n=10	0,328 [0,304÷0,348]	0,321 [0,305÷0,331]	0,326 [0,306÷0,338]	0,323 [0,308÷0,351]
	2-ая групп проб $\Delta E_{MDA}$ микросом + ацетилхолин, n=10	0,339 [0,328÷0,349] $P_{2-1} = 0,179$	0,361 [0,35 ÷ 0,37] $P_{2-1} = 0,004$	0,609 [0,57÷0,662] $P_{2-1} = 0,004$	0,844 [0,828÷0,855] $P_{2-1} = 0,005$
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб $\Delta E_{MDA}$ микросом, n=10	14,6 [14,4 ÷ 15,3] $P_{3-1} = 0,003$ $P_{3-2} = 0,004$	14,7 [14,1 ÷ 15,6] $P_{3-1} = 0,003$ $P_{3-2} = 0,0003$	14,9 [14,2 ÷ 16,3] $P_{3-1} = 0,00006$ $P_{3-2} = 0,0003$	14,4 [14,6÷16,1] $P_{3-1} = 0,00006$ $P_{3-2} = 0,0003$
	4-ая группа проб $\Delta E_{MDA}$ микросом + ацетилхолин, n=10	12,2 [11,2÷12,7] $P_{4-1} = 0,0107$ $P_{4-2} = 0,0039$ $P_{4-3} = 0,004$	12,1 [11,8 ÷ 12,6] $P_{4-1} = 0,02$ $P_{4-2} = 0,004$ $P_{4-3} = 0,004$	12,9 [12,7÷13,4] $P_{4-1} = 0,0197$ $P_{4-2} = 0,004$ $P_{4-3} = 0,004$	13,5 [13,0÷13,8] $P_{4-1} = 0,0003$ $P_{4-2} = 0,004$ $P_{4-3} = 0,004$
Окислительная активность ацетилхолина инкубационной среды		+ 16,8 % [12,3÷26,9]	+ 18,3 % [15,8 ÷ 21,5]	+ 15,6 % [11,9 ÷ 16,5]	+ 10,1 % [8,7 ÷ 15,2]

Табл. 18. Влияние ацетилхолина  $1,1 \times 10^{-3}$  М –  $1,1 \times 10^{-6}$  М на ферментативное (NADP•Н- зависимое) окисление липидов микросом печени крыс (содержание малонового диальдегида, нмоль /мг белка)

Мольная концентрация ацетилхолина инкубационной среды		$10^{-3}$ М	$10^{-4}$ М	$10^{-5}$ М	$10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб $\Delta E_{MДА}$ микросом, n=10	0,309 [0,221÷0,331]	0,312 [0,226÷0,339]	0,311 [0,211÷0,329]	0,310 [0,219÷0,336]
	2-ая групп проб $\Delta E_{MДА}$ микросом + ацетилхолин, n=10	0,812 [0,800÷0,831] $P_{2-1} = 0,00394$	0,621 [0,607÷0,636] $P_{2-1} = 0,002$	0,555 [0,440÷0,668] $P_{2-1} = 0,002$	0,558 [0,442÷0,642] $P_{2-1} = 0,004$
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб $\Delta E_{MДА}$ микросом, n=10	4,416 [4,081÷4,603] $P_{3-1} = 0,0001$ $P_{3-2} = 0,0197$	4,406 [4,189÷4,614] $P_{3-1} = 0,004$ $P_{3-2} = 0,004$	4,411 [4,206÷4,703] $P_{3-1} = 0,0003$ $P_{3-2} = 0,004$	4,516 [4,213÷4,623] $P_{3-1} = 0,00006$ $P_{3-2} = 0,0197$
	4-ая группа проб $\Delta E_{MДА}$ микросом + ацетилхолин, n=10	3,703 [3,608÷3,836] $P_{4-1} = 0,02$ $P_{4-2} = 0,004$ $P_{4-3} = 0,002$	3,462 [3,282÷3,608] $P_{4-1} = 0,0003$ $P_{4-2} = 0,004$ $P_{4-3} = 0,002$	3,331 [3,115÷3,589] $P_{4-1} = 0,004$ $P_{4-2} = 0,002$ $P_{4-3} = 0,004$	3,331 [3,105÷3,492] $P_{4-1} = 0,02$ $P_{4-2} = 0,004$ $P_{4-3} = 0,002$
Окислительная активность ацетилхолина инкубационной среды		+ 29,6 % [ 21,3÷32,7]	+ 30,6 % [27,5 ÷ 36,4]	+ 32,3 % [24,0÷40,3]	+ 34,1 % [30,9 ÷ 36,8]

Сопоставляя результаты экспериментов АХ ткани печени (АХ in situ) и АХ in vitro, можно отметить, что определялись противоположные по направлению тенденции – с изменением мольной концентрации АХ ткани печени происходило изменение содержания ДК ОЛ, МЭЖК Арахис ОЛ и МЭЖК Эйкоза ОЛ; отмечалось снижение содержания  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени, но регистрировали повышение уровня ГП ОЛ печени и увеличение содержания МДА и, в целом, отмечали увеличение выраженности продуктов ПОЛ печени и введения АХ в ткань печени. Индуцирование же ПОЛ микросом печени, как неферментативными, так и ферментативными механизмами in vitro и присутствие АХ мольных концентраций ( $10^{-3}$  М;  $10^{-4}$  М;  $10^{-5}$  М;  $10^{-6}$  М) вызывало противоположный эффект – уменьшение окисления липидов микросом печени.

Следовательно, на основании сопоставления данных введения АХ в ткань печени и на основании данных ПОЛ, индуцированного in vitro в присутствии АХ инкубационной среды, можно сделать вывод, что химические элементы АХ (атом азота, атомы кислорода в структуре АЦХ) не способствуют росту ПОЛ печени.

### 3.5. Резюме к главе 3

Таким образом, холодовая нагрузка периода 3 ч приводила к уменьшению содержания адреналина, но увеличивала содержание НА. При этом отмечали увеличение выраженности йодного числа ОЛ и фракции СЖК печени, числа *trans*-изомеров (на примере ЖК Δ 9,12 C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой), уменьшение содержания МЭЖК Арахис ОЛ печени и рост содержания МЭЖК Эйкоза ОЛ печени.

Холодовая нагрузка в течение 3 ч уменьшала выраженность ТФК ткани печени, содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови, но увеличивала способность гомогената печени продуцировать АФК. Отмечали увеличение ДК ОЛ печени и снижение содержания ГП ОЛ печени; снижение α-токоферола и уменьшение содержания МДА ткани печени.

Введение на этом фоне охлаждения животных непрямого, периферического М,Н-холиномиметика неостигмина приводило к увеличению выраженности адреналина; увеличивало переход ЖК из *cis*- в *trans*-изомеры ЖК; отмечали рост содержания МЭЖК Арахис ОЛ и МЭЖК Эйкоза ОЛ печени; снижалось содержание ТФК ткани печени, но увеличивалась способность гомогената печени продуцировать АФК и происходило это при снижении содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени. Отмечали снижение содержания и α-токоферола, но увеличение МДА ткани печени.

Выясняя вопрос о возможном влиянии химических элементов неостигмина к индуцированию ПОЛ ткани печени, было выяснено, что активация неферментативного окисления микросом печени и присутствие неостигмина не способствовало развитию ПОЛ, активация же ферментативного механизма ПОЛ усиливало феномен одноэлектронного окисления липидов печени. Разнонаправленность результатов экспериментов в присутствии неостигмина и полученных *in vivo* и *in vitro*, заставило нас высказать предположение, что полученные результаты объясняются присутствием неостигмина в тканевой среде печени и одновременной активацией ферментных механизмов ПОЛ печени, или это, всё-таки, результат работы эндогенного АХ с mAChRs метаботропных G-белков и nAChRs лиганд-проводящих участков ионных каналов плазматической мембраны гепатоцитов.

АХ ткани печени различной мольной концентрации приводил к результатам, свидетельствующим о увеличении содержания как ГП ОЛ, так и МДА, но на фоне снижения ДК ОЛ печени. С изменением мольной концентрации АХ менялась выраженность и МЭЖК Арахис ОЛ, МЭЖК Эйкоза ОЛ и отмечали уменьшение содержания α-токоферола ОЛ печени.

Следовательно, в присутствии АХ происходили изменения содержания продуктов ПОЛ и субстратных составляющих ПОЛ печени. Индуцирование же ПОЛ микросом печени *in vitro* в присутствии АХ уменьшало окисление липидов микросом.

Суммируя результаты, полученные *in vivo* и *in vitro*, можно сделать общий вывод, что введение животным неостигмина периода 3 ч холода ускоряет окислительную трансформацию продуктов ПОЛ печени, увеличивает выраженность субстратных составляющих ПОЛ печени и влияет на изменение условий, способствующих изменению ПОЛ печени. Введение АХ в ткань печени *in situ* свидетельствовало об увеличении содержания продуктов ПОЛ и ускорении окислительной трансформации продуктов ПОЛ, и по направленности эффекты АХ ткани печени напоминали эффекты неостигмина, полученные *in vivo*. Окисление же липидов микросом печени *in vitro* в присутствии АХ препятствовало окислению липидов при индуцировании ПОЛ ферментативными и неферментативными механизмами.

Таким образом, сопоставление данных окисления липидов в присутствии АХ *in vivo* и *in vitro* с данными, полученными в присутствии неостигмина *in vivo* и *in vitro*, служат основой для выдвижения рабочей гипотезы об участии холинергических механизмов плазматической мембраны печени в ПОЛ печени. Подтверждением или опровержением данного предположения и будут посвящены последующие главы выполненной работы.

## Глава 4

# ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИЙ ХОЛИНОМИМЕТИКОВ И ХОЛИНОБЛОКАТОРОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОДУКТОВ И СУБСТРАТНЫХ СОСТАВЛЯЮЩИХ ПОЛ ПЕЧЕНИ КРЫС IN VIVO И IN VITRO ПОСЛЕ 3-ЧАСОВОЙ И 5-ДНЕВНОЙ ХОЛОДОВОЙ НАГРУЗКИ

Результаты исследований предыдущей главы требуют выяснения вопроса о участии только периферических mAChRs плазматических мембран гепатоцитов и оценки их влияния на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени периода холодových нагрузок, что безусловно обосновывает применение метода возбуждения периферических mAChRs метаботропных G-белков эндогенным АХ [72; 73].

Применение данного методического подхода экспериментальной фармакологии позволяло решать многие задачи не только в теоретической медицине [72], но и в клинике [73; 110; 136].

Приём экспериментальной фармакологии, вызывающий возбуждение периферических mAChRs метаботропных G-белков плазматических мембран клеток эндогенным АХ, предопределяет предварительное введение животным периферического Н-холинолитика с целью исключения влияния эндогенного АХ на периферические никотиночувствительные структуры лиганд-проводящих ионных каналов плазматической мембраны гепатоцитов [72].

Поэтому одной из задач данного раздела работы являлось выяснение вопросов, определяющих изменение содержания продуктов ПОЛ печени при введении животным периферического Н-холинолитика гексаметония и оценки способности липидов микросом печени к окислению in vitro в присутствии гексаметония с сопоставлением полученных результатов.

#### 4.1. Влияние гексаметония на содержание продуктов ПОЛ печени при 3-часовом охлаждении животных. Сопоставление результатов, полученных *in vivo*, с результатами ПОЛ микросом печени в присутствии гексаметония *in vitro*

При выполнении работы, за 30 мин до охлаждения, животным опытных групп вводили гексаметоний в дозах 0,2 мг/кг; 2 мг/кг и 20 мг/кг. Животным контрольных групп (контроль-1, контроль-2), также, за 30 мин до охлаждения в/бр вводили физиологический раствор.

Для облегчения сопоставления результатов экспериментов, полученных *in vivo*, с результатами экспериментов, проведенных *in vitro*, демонстрировали изменения содержания продуктов ПОЛ *in vivo* (ДК ОЛ, ГП ОЛ печени и МДА ткани печени) с результатами ПОЛ *in vitro* (МДА). Результаты представлены в таблицах 19–30.

Так, 3-часовая холодовая нагрузка животных достоверно увеличивала ДК ОЛ и достоверно уменьшала выраженность ГП ОЛ печени. Введение животным на этом фоне гексаметония (0,2 мг/кг; 2 мг/кг; 20 мг/кг) вызывало снижение содержания как ДК ОЛ, так и ГП ОЛ печени в сравнении с данными животных, подвергавшихся только охлаждению (табл. 19).

**Табл. 19.** Влияние гексаметония на содержание диеновых конъюгатов и гидроперекисей общих липидов печени (нмоль/мг липида) после 3-часового охлаждения крыс

Показатели	Диеновые конъюгаты	Гидроперекиси
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	143,2 [133,9 ÷ 155,8]	11,0 [9,46 ÷ 15,7]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	192,1 [180,5 ÷ 203,3] $P_{2-1} = 0,00394$	8,32 [7,04 ÷ 9,25] $P_{2-1} = 0,00394$
3-ья группа, опыт-1 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n=10	118,5 [112,2 ÷ 148,6] $P_{3-1} = 0,0249$ $P_{3-2} = 0,00394$	5,04 [3,68 ÷ 6,02] $P_{3-1} = 0,00216$ $P_{3-2} = 0,000131$
4-ая группа, опыт-2 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10	141,2 [126,6 ÷ 161,1] $P_{4-1} = 0,872$ $P_{4-2} = 0,00394$ $P_{4-3} = 0,0373$	6,01 [5,62 ÷ 7,01] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,0423$ $P_{4-3} = 0,0163$
5-ая группа, опыт-3 (холод + гексаметоний 20 мг/кг), n=10	113,7 [95,6 ÷ 132,4] $P_{5-1} = 0,00394$ $P_{5-2} = 0,00216$ $P_{5-3} = 0,423$ $P_{5-4} = 0,0104$	6,63 [5,8 ÷ 7,18] $P_{5-1} = 0,00394$ $P_{5-2} = 0,00394$ $P_{5-3} = 0,00513$ $P_{5-4} = 0,149$

Необходимо отметить, что увеличение вводимой дозы гексаметония в опытных группах животных (опыт-2; опыт-3) приводило к росту содержания ГП ОЛ при сравнении с данными группы животных опыт-1. Так, если содержание ГП ОЛ печени группы опыт-1 оценивали в 5,04 (3,68 ÷ 6,02) нмоль/мг липида, то дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг увеличивали содержание ГП ОЛ на 19,2% и 31,5% в сравнении с группой животных опыт-1, но оставались статистически достоверно меньшими при сравнении с группой животных контроль-2, соответственно.

Оценивая содержание МДА водной фазы гомогената печени, отмечали, что 3-часовая холодовая нагрузка не увеличивала содержание МДА ткани печени, а введение животным гексаметония приводило к более выраженному снижению МДА при сравнении с данными животных группы контроль-2. Так, в группах животных опыт-1 и опыт-2 снижение МДА отмечали в 1,23 раза и в 1,16 раза отчётливей, чем в группе животных контроль-2. В группе же животных опыт-3 содержание ТБК-активного продукта определяли на уровне данных животных группы контроль-2, соответственно. Необходимо отметить, что с увеличением вводимой дозы гексаметония (2 мг/кг; 20 мг/кг) увеличивалась выраженность и МДА ткани печени, но оставалась статистически достоверно меньшей по отношению к группе животных контроль-2, соответственно (табл. 20).

**Табл. 20.** Влияние гексаметония на содержание малонового диальдегида гомогената печени (нмоль/мл гомогената) после 3-часового охлаждения крыс

Показатели	Малоновый диальдегид
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	1,966 [1,848 ÷ 2,108]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	1,745 [1,586 ÷ 1,8] P <sub>2-1</sub> = 0,00394
3-ья группа, опыт-1 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n=10	1,417 [1,297 ÷ 1,5] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,0115
4-ая группа, опыт-2 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10	1,5 [1,41 ÷ 1,56] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,0781
5-ая группа, опыт-3 (холод + гексаметоний 20 мг/кг), n=10	1,775 [1,613 ÷ 1,821] P <sub>5-1</sub> = 0,00216 P <sub>5-2</sub> = 0,862 P <sub>5-3</sub> = 0,00291 P <sub>5-4</sub> = 0,01

Таким образом, введение животным Н-холинолитика гексаметония (0,2 мг/кг; 2 мг/кг; 20 мг/кг) периода 3 ч охлаждения животных вызывало снижение ДК ОЛ, ГП ОЛ печени и в дозах 0,2 мг/кг; 2 мг/кг – снижение МДА ткани печени. На наш взгляд, следует отметить, что увеличение вводимой дозы гексаметония (2 мг/кг; 20 мг/кг) приводило к росту как ГП ОЛ печени (см. табл. 19), так и к увеличению МДА в ткани печени (см. табл. 20). В случае определения ГП ОЛ печени это увеличение оставалось статистически достоверным по отношению к группе животных контроль-2, а в случае определения МДА – только введение гексаметония дозы 2 мг/кг оставалось статистически достоверно меньшим.

Безусловно, присутствие атомов азота углеводородной цепи гексаметония [79] способно индуцировать одноэлектронное окисление и восстановление липидов тканей печени [89]. Поэтому постановка вопроса о том, что периферический Н-холинолитик гексаметоний способен входящими в его структуру гетероатомами (атомы азота) обладать способностью индуцировать переменную валентность, вызвало решение о проведении ряда экспериментов *in vitro* с присутствием в инкубационной среде гексаметония мольных концентраций, соответствующих дозам гексаметония, вводимого животным.

Результаты экспериментов окисления липидов микросом печени в присутствии гексаметония *in vitro* свидетельствовали, что гексаметоний вызывал усиление ПОЛ печени во всех предложенных мольных концентрациях ( $10^{-4}$  М;  $10^{-5}$  М;  $10^{-6}$  М) и индуцировал ферментативные механизмы окисления липидов (табл. 21).

**Табл. 21.** Влияние гексаметония на ферментативное (NADP•Н-зависимое) ПОЛ микросом печени *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Мольная концентрация гексаметония в инкубационной среде		$10^{-4}$ М	$10^{-5}$ М	$10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб $\Delta E_{MДА}$ микросом, n=10	0,403 [0,358 ÷ 0,469]	0,402 [0,361 ÷ 0,473]	0,401 [0,352 ÷ 0,456]
	2-ая групп проб $\Delta E_{MДА}$ микросом + гексаметоний, n=10	0,126 [0,112 ÷ 0,138] $P_{2-1} = 0,00394$	0,171 [0,165 ÷ 0,181] $P_{2-1} = 0,00394$	0,112 [0,106 ÷ 0,124] $P_{2-1} = 0,00394$
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб $\Delta E_{MДА}$ микросом, n=10	10,165 [9,645 ÷ 11,812] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,0448$	10,183 [9,715 ÷ 11,633] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,00421$	10,217 [9,562 ÷ 11,724] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,0151$
	4-ая группа проб $\Delta E_{MДА}$ микросом + гексаметоний, n=10	10,890 [9,906 ÷ 11,912] $P_{4-1} = 0,00216$ $P_{4-2} = 0,00197$ $P_{4-3} = 0,145$	11,053 [10,107 ÷ 12,01] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00045$ $P_{4-3} = 0,262$	11,9 [10,76 ÷ 12,561] $P_{4-1} = 0,0256$ $P_{4-2} = 0,0001$ $P_{4-3} = 0,0085$
Окислительная активность гексаметония в инкубационной среде			-8,7% [-4,4 ÷ -16,5]	-12,2% [-4,9 ÷ -22,4]

Сопоставляя результаты экспериментов *in vivo* и *in vitro* в присутствии гексаметония, необходимо было обратить внимание на следующие факты: Н-холинолитик гексаметоний снижал содержание продуктов ПОЛ печени (см. табл. 19 и 20), а нахождение в инкубационной среде и индуцирование ПОЛ ферментативными механизмами способствовало усилению окисления липидов печени.

Таким образом, гексаметоний (0,2 мг/кг; 2 мг/кг; 20 мг/кг) на фоне 3-часового охлаждения снижал содержание ДК ОЛ, ГП ОЛ печени, а в дозах 0,2 мг/кг и 2 мг/кг снижал содержание и МДА. Окисление же липидов микросом печени в присутствии гексаметония мольных концентраций  $10^{-4}$  М;  $10^{-5}$  М;  $10^{-6}$  М и индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ вызывало противоположный эффект – увеличение окисления липидов микросом печени.

При сопоставлении результатов, полученных *in vivo*, необходимо было сделать акцент на следующих фактах: с увеличением вводимой дозы гексаметония (2 мг/кг; 20 мг/кг) отмечался рост ГП ОЛ, но повышение оставалось статистически достоверным по отношению к результатам, полученным от животных, подвергавшихся только охлаждению. В случае определения МДА ткани печени дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг вызывали увеличение содержания МДА, но только в случае применения дозы гексаметония 2 мг/кг изменения МДА ткани печени оставались меньшими и статистически достоверными по отношению к группе животных, подвергавшихся только охлаждению.

Сопоставляя данные *in vitro* и *in vivo* в присутствии гексаметония, можно сделать основной вывод, что уменьшение содержания продуктов ПОЛ печени *in vivo* при применении предложенных доз гексаметония экспериментальным животным объяснить свойствами химических элементов гексаметония, способных индуцировать переменную валентность, считаем невозможными.

## **4.2. Результаты введения неостигмина на фоне гексаметония и оценка содержания продуктов ПОЛ печени при 3-часовом охлаждении крыс. Сопоставление результатов ПОЛ, полученных *in vivo*, с окислением липидов микросом печени *in vitro* в присутствии комбинации неостигмина и гексаметония**

Так как методический приём экспериментальной фармакологии связан с возбуждением периферических mAChRs метабототропных G-белков плазматической мембраны эндогенным АХ предусматривает предварительное введение животным периферического Н-холинолитика [72], то по результа-

там экспериментов, полученных *in vivo* и *in vitro* в присутствии гексаметония, было высказано предположение, что причиной изменений содержания продуктов ПОЛ печени *in vivo* не являются химические элементы, находящиеся в структуре гексаметония. Поэтому выполнение следующего этапа нашей работы было посвящено эффектам неостигмина, вводимого на фоне гексаметония, при 3-часовой холодовой нагрузке.

Результаты экспериментов свидетельствовали, что неостигмин на фоне гексаметония статистически достоверно увеличивал содержание ДК ОЛ, ГП ОЛ групп животных опыт-1, опыт-2 и ГП ОЛ группы животных опыт-3. У животных группы опыт-3 статистически достоверного увеличения содержания ДК ОЛ печени нами не было отмечено (табл. 22).

**Табл. 22.** Влияние неостигмина на фоне гексаметония на содержание диеновых конъюгатов и гидроперекисей общих липидов печени (нмоль/мг липида) при 3-часовом охлаждении крыс

Показатели	Диеновые конъюгаты	Гидроперекиси
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n = 10	137,9 [128,7 ÷ 142,1]	4,4 [4,0 ÷ 4,8]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n = 10	187,8 [166,0 ÷ 198,1] P <sub>2-1</sub> = 0,00394	3,7 [3,0 ÷ 3,9] P <sub>2-1</sub> = 0,00394
3-ья группа, опыт-1 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n = 10	209,5 [199,5 ÷ 214,8] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,0161	9,825 [8,4 ÷ 10,9] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00045
4-ая группа, опыт-2 (холод + гексаметоний 2 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n = 10	222,4 [200,7 ÷ 258,2] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00212 P <sub>4-3</sub> = 0,00394	9,018 [8,6 ÷ 9,3] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,0056 P <sub>4-3</sub> = 0,2
5-ая группа, опыт-3 (холод + гексаметоний 20 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n = 10	187,8 [163,4 ÷ 192,3] P <sub>5-1</sub> = 0,00216 P <sub>5-2</sub> = 0,688 P <sub>5-3</sub> = 0,00394 P <sub>5-4</sub> = 0,000297	4,4 [3,6 ÷ 5,8] P <sub>5-1</sub> = 1,0 P <sub>5-2</sub> = 0,00648 P <sub>5-3</sub> = 0,00394 P <sub>5-4</sub> = 0,00386

Неостигмин, вводимый на фоне гексаметония, не вызывал достоверного увеличения содержания МДА ткани печени (табл. 23).

Напомним, что по результатам предыдущих исследований холодовая нагрузка (3 ч) увеличивала содержание только ДК ОЛ печени и снижение содержания ГП ОЛ, МДА гомогената печени. Неостигмин же, вводимый на фоне гексаметония и кратковременной холодовой нагрузки (3 ч), показывал увеличение ДК ОЛ, ГП ОЛ печени и снижал содержание ТБК-активного продукта – МДА. (Напомним, что введение на фоне 3 ч холода только неостигмина уменьшало выраженность ДК ОЛ и ГП ОЛ, но способствовало росту содержания МДА ткани печени).

**Табл. 23.** Влияние неостигмина на фоне гексаметония на содержание малонового диальдегида в печени (нмоль/мл гомогената) при 3-часовом охлаждении крыс

Показатели	Малоновый диальдегид
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	1,7 [1,4 ÷ 1,9]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	1,2 [1,1 ÷ 1,4] P <sub>2-1</sub> = 0,00394
3-ья группа, опыт-1 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10	0,79 [0,7 ÷ 0,82] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,0256
4-ая группа, опыт-2 (холод + гексаметоний 2 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10	0,821 [0,791 ÷ 0,882] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,0131 P <sub>4-3</sub> = 0,0781
5-ая группа, опыт-3 (холод + гексаметоний 20 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10	0,87 [0,837 ÷ 0,94] P <sub>5-1</sub> = 0,00394 P <sub>5-2</sub> = 0,00394 P <sub>5-3</sub> = 0,004 P <sub>5-4</sub> = 0,46

Получив данные введения животным неостигмина на фоне гексаметония, оставался нерешённым вопрос о возможном влиянии химических элементов комбинации неостигмина, гексаметония и влияния их на содержание продуктов ПОЛ печени. Для ответа на этот вопрос был проведен ряд экспериментов с индуцированием ПОЛ *in vitro* неферментативными и ферментативными механизмами в присутствии комбинации фармакологических агентов неостигмина, гексаметония и микросом печени.

Полученные результаты свидетельствовали, что индуцированием неферментативных механизмов ПОЛ отмечался слабый антиокислительный эффект, возникающий в присутствии фармакологических агентов неостигмина и гексаметония, и по мере уменьшения мольной концентрации гексаметония в инкубационной среде этот эффект возрастал в 4,15 раз при мольной концентрации гексаметония  $10^{-5}$  М и в 8,6 раза при мольной концентрации гексаметония  $10^{-6}$  М инкубационной среды (табл. 24).

**Табл. 24.** Влияние неостигмина и гексаметония на индуцирование неферментативного (аскорбатзависимого) ПОЛ микросом печени *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Неостигмин $10^{-4}$ М + Гексаметоний $10^{-4}$ М	Неостигмин $10^{-4}$ М + Гексаметоний $10^{-5}$ М	Неостигмин $10^{-4}$ М + Гексаметоний $10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ДЕМДА микросом, n=10	0,307 [0,289 ÷ 0,308]	0,304 [0,291 ÷ 0,311]	0,306 [0,293 ÷ 0,326]

	2-ая групп проб ДЕМДА микросом, неостигмин + гексаметоний, n=10	0,309 [0,308 ÷ 0,398] $P_{2-1} = 0,0216$	0,320 [0,314 ÷ 0,392] $P_{2-1} = 0,0216$	0,321 [0,318 ÷ 0,332] $P_{2-1} = 0,0346$
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ДЕМДА микросом, n=10	19,118 [19,01 ÷ 19,311] $P_{3-1} = 0,001$ $P_{3-2} = 0,0216$	19,31 [19,23 ÷ 19,501] $P_{3-1} = 0,00566$ $P_{3-2} = 0,048$	19,2 [19,12 ÷ 19,515] $P_{3-1} = 0,0001$ $P_{3-2} = 0,00394$
	4-ая группа проб ДЕМДА микросом, неостигмин + гексаметоний, n=10	19,1 [18,907 ÷ 19,307] $P_{4-1} = 0,0016$ $P_{4-2} = 0,0394$ $P_{4-3} = 0,06$	19,24 [19,07 ÷ 19,26] $P_{4-1} = 0,000318$ $P_{4-2} = 0,00197$ $P_{4-3} = 0,048$	19,05 [18,91 ÷ 19,11] $P_{4-1} = 0,0001$ $P_{4-2} = 0,004$ $P_{4-3} = 0,00394$
Окислительная активность неостигмина и гексаметония		+ 0,106% [+0,093 ÷ + 0,13]	+ 0,44% [+0,38 ÷ +0,53]	+0,92% [+0,88 ÷ +0,103]

Индукирование же ферментативных механизмов ПОЛ и присутствии неостигмина и гексаметония вызывало усиление окислительного эффекта, возрастающего по мере уменьшения мольной концентрации гексаметония инкубационной среды (табл. 25).

**Табл. 25.** Влияние неостигмина и гексаметония на индуцирование ферментативного (NADP•H-зависимого) ПОЛ микросом печени *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Неостигмин $10^{-4}$ М + Гекса- метоний $10^{-4}$ М	Неостигмин $10^{-4}$ М + Гекса- метоний $10^{-5}$ М	Неостигмин $10^{-4}$ М + Гекса- метоний $10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ДЕМДА микросом, n=10	0,388 [0,291 ÷ 0,390]	0,380 [0,364 ÷ 0,386]	0,372 [0,311 ÷ 0,381]
	2-ая групп проб ДЕМДА микросом, неостигмин + гексаметоний, n=10	0,401 [0,395 ÷ 0,418] $P_{2-1} = 0,0216$	0,399 [0,390 ÷ 0,412] $P_{2-1} = 0,002$	0,398 [0,385 ÷ 0,418] $P_{2-1} = 0,006$
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ДЕМДА микросом, n=10	10,402 [9,902 ÷ 10,681] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,004$	10,396 [10,01 ÷ 10,65] $P_{3-1} = 0,00566$ $P_{3-2} = 0,048$	10,381 [9,911 ÷ 10,716] $P_{3-1} = 0,0003$ $P_{3-2} = 0,00165$
	4-ая группа проб ДЕМДА микросом, неостигмин + гексаметоний, n=10	10,711 [10,69 ÷ 10,912] $P_{4-1} = 0,0001$ $P_{4-2} = 0,0022$ $P_{4-3} = 0,00394$	10,756 [10,68 ÷ 11,02] $P_{4-1} = 0,0006$ $P_{4-2} = 0,00316$ $P_{4-3} = 0,0216$	10,811 [10,798 ÷ 10,965] $P_{4-1} = 0,0005$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00394$
Окислительная активность неостигмина и гексаметония		- 2,8% [-1,13 ÷ -2,93]	- 3,4% [-2,98 ÷ -3,53]	- 4,1 % [-3,88 ÷ -4,4]

Сопоставляя данные, полученные *in vivo* и *in vitro*, мы не смогли ответить на вопрос, чем объяснить повышение содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени при введении животным неостигмина на фоне гексаметония, – комбинацией химических элементов, входящих в молекулярные структуры неостигмина и гексаметония, или всё-таки работой эндогенного АХ с mAChRs G-белков плазматической мембраны гепатоцитов. Применяя методический приём экспериментальной фармакологии – прием реципрокности, мы попытались дать ответ, используя М-холиноблокатор метацин.

### 4.3. Результаты окисления липидов микросом печени, полученные *in vitro* в присутствии метацина

Перед применением метацина *in vivo* необходимо было определить способность М-холинолитика метацина участвовать в одноэлектронном окислении и восстановлении липидов печени. С этой целью нами были проведены эксперименты индуцирования ПОЛ микросом печени с присутствием в инкубационной среде данного фармакологического агента.

Экспериментальные данные свидетельствовали, что окисление липидов микросом, индуцированное ферментативными механизмами в присутствии метацина мольной концентрации  $10^{-4}$  М и  $10^{-5}$  М вызывало противоположные по направлению результаты. Так, если мольная концентрация метацина  $10^{-5}$  М инкубационной среды способствовала усилению окисления липидов микросом печени и оценивалась в -6,1%, то мольная концентрация метацина  $10^{-4}$  М препятствовала увеличению окисления липидов микросом печени и оценивалась в +13,8% (табл. 26).

**Табл. 26.** Влияние метацина ( $10^{-4}$  М;  $10^{-5}$  М) на ферментативное (NADP•Н-зависимое) окисление липидов микросом *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Концентрация метацина инкубационной среды		$10^{-4}$ М	$10^{-5}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ΔЕмда микросом, n = 10	0,169 [0,111 ÷ 0,248]	0,188 [0,128 ÷ 0,231]
	2-ая групп проб ΔЕмда микросом + метацин, n = 10	0,461 [0,260 ÷ 1,108] P <sub>2-1</sub> = 0,00394	0,464 [0,34 ÷ 0,845] P <sub>2-1</sub> = 0,00395
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ΔЕмда микросом, n=10	2,273 [1,125 ÷ 2,506] P <sub>3-1</sub> = 0,0205 P <sub>3-2</sub> = 0,004	2,365 [2,245 ÷ 2,511] P <sub>3-1</sub> = 0,00297 P <sub>3-2</sub> = 0,004
	4-ая группа проб ΔЕмда микросом + метацин, n = 10	2,37 [1,976 ÷ 2,732] P <sub>4-1</sub> = 0,001 P <sub>4-2</sub> = 0,00513 P <sub>4-3</sub> = 0,521	2,763 [2,516 ÷ 3,172] P <sub>4-1</sub> = 0,0001 P <sub>4-2</sub> = 0,0003 P <sub>4-3</sub> = 0,216
Окислительная активность метацина		+ 13,8% [+7,5 ÷ +22,7]	- 6,1% [-12,2 ÷ +1,28]

Такой же эффект – разнонаправленность окисления липидов микросом печени и присутствии метацина – нами был получен индуцированием неферментативных механизмов окисления липидов *in vitro*. Так, если мольная концентрация метацина  $10^{-5}$  М инкубационной среды и активации неферментативных механизмов окисления липидов микросом приводила к усилению окислительной активности метацина, оцененной в -12,8 %, то концентрация метацина  $10^{-4}$  М ослабляла эту активность и окислительная активность метацина оценивалась в +0,676 % (табл. 27).

Суммируя факты, полученные *in vitro*, можно было отметить, что М-холиноблокатор метацин, в присутствии липидов МЭРГ и индуцировании ПОЛ неферментативными, ферментативными механизмами вызывал противоположные по направлению эффекты – метацин инкубационной среды, мольной концентрации  $10^{-5}$  М усиливал, а мольной концентрации  $10^{-4}$  М ослаблял окисление липидов микросом печени.

**Табл. 27.** Влияние метацина ( $10^{-4}$  М;  $10^{-5}$  М) на неферментативное (аскорбатзависимое) окисление липидов микросом *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Концентрация метацина инкубационной среды		$10^{-4}$ М	$10^{-5}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ΔЕМДА микросом, n = 10	0,300 [0,262 ÷ 0,372]	0,307 [0,262 ÷ 0,372]
	2-ая групп проб ΔЕМДА микросом + метацин, n = 10	0,489 [0,400 ÷ 0,565] P <sub>2-1</sub> = 0,00394	0,367 [0,221 ÷ 0,511] P <sub>2-1</sub> = 0,699
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ΔЕМДА микросом, n = 10	0,796 [10,143 ÷ 11,536] P <sub>3-1</sub> = 0,0003 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	1,004 [10,143 ÷ 11,536] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216
	4-ая группа проб ΔЕМДА микросом + метацин, n = 10	10,954 [9,451 ÷ 12,903] P <sub>4-1</sub> = 0,00216 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,927	12,41 [12,378 ÷ 12,544] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,00216
Окислительная активность метацина		+ 0,676% [-10,5 ÷ +8,4]	-12,8% [-23,1 ÷ -7,78]

Проводя тепловую инактивацию белковых структур мембран микросом печени получили результаты, свидетельствующие об уменьшении окисления липидов микросом печени индуцированием ферментативных механизмов ПОЛ (табл. 28).

Важно отметить, что, если *in vitro* индуцирование ПОЛ микросом печени в присутствии метацина вызывало усиление окисления липидов, то тепло-

**Табл.28.** Влияние метацина ( $10^{-4}$  М;  $10^{-5}$  М) на ферментативное (NADP•Н-зависимое) окисление липидов микросом печени крыс после тепловой обработки *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Концентрация метацина инкубационной среды		$10^{-4}$ М	$10^{-5}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ΔЕМДА микросом, n = 10	0,804 [0,745÷0,883]	0,809 [0,745÷0,883]
	2-ая групп проб ΔЕМДА микросом + метацин, n = 10	1,212 [1,159 ÷ 1,981] $P_{2-1} = 0,0161$	0,912 [0,828÷1,104] $P_{2-1} = 0,0249$
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ΔЕМДА микросом, n=10	1,223 [1,208÷1,242] $P_{3-1} = 0,00674$ $P_{3-2} = 0,688$	1,228 [1,208÷1,242] $P_{3-1} = 0,000131$ $P_{3-2} = 0,00394$
	4-ая группа проб ΔЕМДА микросом + метацин, n = 10	1,162 [1,048 ÷ 1,214] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,109$ $P_{4-3} = 0,0131$	1,162 [1,148÷1,186] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00394$ $P_{4-3} = 0,00216$
Окислительная активность метацина		+ 116,4% [+94,5 ÷ +122,5]	+ 40,8% [+29,9 ÷ +86,7]

вая инактивация активности белка микросом печени вызывала противоположный эффект – уменьшение окисления липидов микросом печени. Факты, полученные нами *in vitro*, в присутствии метацина и микросом печени, подвергшихся тепловой обработке, свидетельствовали о участии белкового компонента МЭРГ в формировании ПОЛ печени и присутствии метацина.

#### 4.4. Содержание продуктов ПОЛ печени при введении крысам неостигмина на фоне гексаметония и отдельного введения метацина при 3-часовой холодовой нагрузке (реципрокность)

Данные экспериментов, проведенные *in vivo*, свидетельствовали, что 3-часовая холодовая нагрузка вызывала увеличение содержания ДК ОЛ печени и снижение содержания ГП ОЛ, МДА ткани печени (см. табл. 8, 10, 11, 19, 20, 22, 23).

Неостигмин, на фоне предварительного введения животным гексаметония, в группе животных опыт-1 увеличивал ДК ОЛ в 1,14 раза и в 1,25 раза в группе животных опыт-2, соответственно. Введение метацина (0,1 мг/кг; 1 мг/кг) вызывало противоположный эффект – снижение содержания ДК

ОЛ печени в группе животных опыт-3 на 24,2 %, и на 7,4 % в группе животных опыт-4. Определяя содержание ГП ОЛ печени отмечали также противоположные по направлению эффекты, достигаемые введением животным неостигмина на фоне гексаметония и отдельного введения метацина. Кроме того, как и предыдущих опытах, охлаждение крыс в течение 3 ч достоверно снижало содержание ГП ОЛ печени при сравнении с группой животных контроль-1 (интактные). Но в этих сериях экспериментов неостигмин на фоне гексаметония снижал содержание ГП ОЛ при сравнении с группой животных опыт-3 и опыт-4, на 3,7% и 15,9%, соответственно. Введение же отдельно метацина приводило неожиданно к противоположному эффекту (неожиданному для применения холиноблокаторов) – росту содержания ГП ОЛ на 11,9% в группе животных опыт-3 и на 8,3% группы животных опыт-4, соответственно (табл. 29).

**Табл. 29.** Влияние неостигмина на фоне гексаметония, влияние отдельно вводимого метацина на содержание диеновых конъюгатов, гидроперекисей общих липидов печени при 3-часовой холодной нагрузке у крыс (содержание диеновых конъюгатов, гидроперекисей общих липидов, нмоль/мг липида)

Показатели	Диеновые конъюгаты	Гидроперекиси
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	112,8 [100,1÷135,2]	9,6 [8,8÷11,3]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	181,7 [176,2÷192,8] P <sub>2-1</sub> = 0,009	8,4 [8,0÷8,9] P <sub>2-1</sub> = 0,00902
3-ья группа, опыт-1 (холод+гексаметоний 0,2 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10	208,2 [199,1 ÷ 228,1] P <sub>3-2</sub> = 0,009	8,09 [7,8÷8,4] P <sub>3-2</sub> = 0,009
4-ая группа, опыт-2 (холод+гексаметоний 2 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10	228,2 [200,6 ÷ 240,2] P <sub>4-2</sub> = 0,005 P <sub>4-3</sub> = 0,174	7,07 [6,8÷7,6] P <sub>4-2</sub> = 0,00902 P <sub>4-3</sub> = 0,01
5-ая группа, опыт-3 (холод + метацин 0,1 мг/кг), n=10	137,8 [120,2÷151,6] P <sub>5-2</sub> = 0,00438 P <sub>5-3</sub> = 0,009 P <sub>5-4</sub> = 0,01	9,4 [8,8÷10,6] P <sub>5-2</sub> = 0,00793 P <sub>5-3</sub> = 0,00902 P <sub>5-4</sub> = 0,01
6-ая группа, опыт-4 (холод + метацин 1 мг/кг), n=10	168,3 [150,2÷182,2] P <sub>6-2</sub> = 0,117 P <sub>6-3</sub> = 0,011 P <sub>6-4</sub> = 0,009 P <sub>6-5</sub> = 0,00793	9,1 [8,7÷9,6] P <sub>6-2</sub> = 0,00902 P <sub>6-3</sub> = 0,001 P <sub>6-4</sub> = 0,000366 P <sub>6-5</sub> = 0,117

Факты экспериментов свидетельствовали, что введение неостигмина на фоне гексаметония и 3-часового охлаждения животных приводило к росту содержания ДК ОЛ и к снижению ГП ОЛ печени, введение же отдельно метацина приводило к противоположным эффектам – к уменьшению ДК ОЛ и к увеличению выраженности в ГП ОЛ печени. Следовательно, полученные результаты свидетельствуют о проявлении реципрокности (разнонаправленности) при оценке содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени.

Определяя короткоцепочечный альдегидный продукт ПОЛ печени – МДА, отмечали, как и в предыдущих экспериментах, что 3-часовая холодовая нагрузка не увеличивала содержание МДА ткани печени. Неостигмин, на фоне предварительно введённого гексаметония, увеличивал содержание ТБК-активного продукта у животных группы опыт-1 в 1,4 раза и в 1,16 раза у животных группы опыт-2, соответственно (табл. 30).

**Табл. 30.** Влияние неостигмина на фоне гексаметония, влияние отдельно вводимого метацина на содержание МДА гомогената печени при 3-часовой холодной нагрузке у крыс (содержание малонового диальдегида, нмоль/мл гомогената)

Показатели	Малоновый диальдегид
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	1,9 [1,7 ÷ 2,2]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	1,2 [1,0 ÷ 1,5] P <sub>2-1</sub> = 0,0003
3-ья группа, опыт-1 (холод+ гексаметоний 0,2 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10	1,7 [1,5 ÷ 1,9] P <sub>3-2</sub> = 0,01
4-ая группа, опыт-2 (холод + гексаметоний 2 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10	1,4 [1,2 ÷ 1,6] P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,004
5-ая группа, опыт-3 (холод + метацин 0,1 мг/кг), n=10	1,0 [0,7 ÷ 1,1] P <sub>5-2</sub> = 0,00617 P <sub>5-3</sub> = 0,0004 P <sub>5-4</sub> = 0,000297
6-ая группа, опыт-4 (холод + метацин 1 мг/кг), n=10	1,25 [0,9 ÷ 1,4] P <sub>6-2</sub> = 0,361 P <sub>6-3</sub> = 0,0242 P <sub>6-4</sub> = 0,0448 P <sub>6-5</sub> = 0,00426

Введение животным отдельно метацина в дозе 0,1 мг/кг вызывало статистически достоверное снижение МДА ткани печени – на 16,7%, а метацин 1 мг/кг, сравнивая с данными животных, подвергавшихся только охлаждению, вызывал повышение МДА на 4,1%, соответственно.

Таким образом, введение неостигмина (0,2 мг/кг) на фоне гексаметония (0,2 мг/кг; 2 мг/кг) увеличивало выраженность МДА ткани печени, а введение метацина (0,1 мг/кг) снижало его содержание.

#### **4.5. Заключение по результатам введения животным гексаметония, введения неостигмина на фоне гексаметония, введения отдельно метацина и оценки содержания продуктов ПОЛ печени периода 3-часового охлаждения животных. Заключение по результатам ПОЛ, полученных *in vitro* и отдельном присутствии гексаметония, комбинации неостигмина и гексаметония, отдельном присутствии метацина в инкубационной среде**

Подводя итог проведенным экспериментам, можно отметить следующее. Гексаметоний (0,2; 2 и 20 мг/кг) при введении животным на фоне 3-часового охлаждения снижал содержание ДК ОЛ, ГП ОЛ печени и в дозах 0,2 и 2 мг/кг снижал также содержание МДА водной фазы гомогената печени. Окисление же липидов микросом в присутствии гексаметония и индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ инкубационной среды вызывало противоположный эффект – увеличение окисления липидов микросом печени.

Следовательно, результаты присутствия гексаметония, полученные *in vivo* и *in vitro*, приводили к разнонаправленным эффектам окисления липидов печени. Полученные результаты являются основой для продолжения проведения экспериментов возбуждения mAChRs эндогенным АХ и связанного с этим введением животным непрямого холиномиметика неостигмина на фоне периферического Н-холиноблокатора гексаметония. Проведенные эксперименты свидетельствовали, что данная комбинация фармакологических агентов приводила к увеличению содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени и снижению МДА ткани печени. Определяя окислительную активность комбинации фармакологических агентов неостигмина и гексаметония *in vitro*, получали результаты, свидетельствующие, что индуцирование неферментативных механизмов ПОЛ приводило к возникновению слабого антиокислительного эффекта. Уменьшение мольной концентрации гексаметония инкубационной среды приводило к возрастанию данного эффекта. Активация же ферментативных механизмов ПОЛ в присутствии неостигмина и гексаметония приводила также к усилению окислительных эффектов, возрастающих с уменьшением мольной концентрации гексаметония инкубационной среды.

Результаты сопоставления полученных данных не позволили однозначно назвать причину повышения содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени, дать оценку снижению содержания МДА, опираясь на мнение, что только химические элементы структур неостигмина и гексаметония, обладающие свойством индуцирования переменной валентности, влияют на ПОЛ печени.

Как альтернативу высказывали предположение, что изменения содержания продуктов ПОЛ печени является результатом работы эндогенного АХ с mAChRs G-белков плазматической мембраны гепатоцитов. Для принятия

окончательного решения применения метода реципрокности были предварительно проведены исследования определения способности метацина к окислению *in vitro* и присутствию липидов микросом печени. Полученные результаты сопоставляли с результатами действия метацина, полученные *in vivo* на фоне 3-часового охлаждения животных. Полученные факты свидетельствовали, что метацин и присутствие липидных компонентов МЭРГ индуцированием ПОЛ *in vitro* неферментативными и ферментативными механизмами способствовало усилению окисления липидов.

Демонстрируя связь между метацином инкубационной среды и белковыми структурами МЭРГ, проводили тепловую инактивацию белка микросом печени, что приводило к неожиданным и противоположным результатам в окислении липидов: присутствие метацина в инкубационной среде и индуцирование ПОЛ ферментативными и неферментативными механизмами уменьшало ПОЛ микросом печени, отмечали возникновение даже антиокислительного эффекта. Мы считаем, что если объединяющим свойством белков плазматической мембраны гепатоцитов и белков МЭРГ является отсутствие выполняемой ими функции после потери активности белка, то факты, полученные нами *in vitro* в присутствии метацина и микросом печени, подвергавшихся тепловой обработке, свидетельствуют об участии белкового компонента плазматических мембран в формировании ПОЛ печени.

Таким образом, факты, полученные *in vivo* свидетельствовали, что введение неостигмина на фоне гексаметония и 3-часового охлаждения животных приводило к росту содержания ДК ОЛ и к совершенно неожиданному результату – к снижению выраженности ГП ОЛ печени. Введение же метацина сопровождалось противоположным эффектом – уменьшало ДК ОЛ и приводило к неожиданному эффекту (для применения М-холинолитиков) – увеличению содержания ГП ОЛ печени.

При обобщении данных по альдегидному продукту ПОЛ печени – МДА, отмечали проявление реципрокности – неостигмин (0,2 мг/кг) на фоне гексаметония (0,2 мг/кг; 2 мг/кг) увеличивал выраженность МДА, а метацин (0,1 мг/кг) снижал его содержание.

#### **4.6. Влияние пилокарпина и атропина на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени, влияние на условия, способствующие развитию ПОЛ печени при 5-дневном охлаждении крыс. Сопоставление результатов окисления липидов печени, полученных *in vivo*, с окислением липидов микросом печени *in vitro* в присутствии пилокарпина и атропина**

В предыдущих разделах работы было показано, что влияние гексаметония на содержание продуктов ПОЛ печени *in vivo* и сопоставление ре-

зультатов с окислением липидов микросом печени, проведенных *in vitro* в присутствии гексаметония, привело к выводам, предполагающим, что нехимические элементы структуры гексаметония влияют на изменение содержания продуктов ПОЛ печени. Это позволило нам в решении поставленных задач (возбуждение периферических mAChRs эндогенным АХ) вводить животным на фоне гексаметония непрямой М,Н-холиномиметик неостигмин.

В результате были получены данные, свидетельствующие, что введение неостигмина на фоне гексаметония при 3-часовой голодовой нагрузке приводило к увеличению содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени. Сопоставление данных *in vivo* с данными, полученными в присутствии неостигмина и гексаметония *in vitro*, не позволило нам всё-таки ответить на вопрос, вызываются ли изменения содержания продуктов ПОЛ печени химическими элементами, входящими в структуру неостигмина и гексаметония, или объясняются комбинационной работой выше перечисленных фармакологических агентов с mAChRs G-белков плазматической мембраны гепатоцитов. Для ответа на этот вопрос потребовалась оценка проявления феномена реципрокности при отдельном от комбинационного применения неостигмина и гексаметония введении М-холиноблокатора. Применение М-холиноблокатора достигалась введением экспериментальным животным метацина (0,1 мг/кг; 1мг/кг). Сопоставление результатов, полученных *in vivo*, с результатами окисления липидов микросом печени *in vitro* и присутствии метацина, позволило нам высказать предположение о участии mAChRs плазматической мембраны гепатоцитов в формировании продуктов ПОЛ печени.

Для принятия окончательного мнения о возможном влиянии mAChRs плазматической мембраны гепатоцитов на содержание продуктов ПОЛ периода голодовых нагрузок потребовалось введение фармакологических агентов, работающих непосредственно, прямо с mAChRs плазматической мембраны гепатоцитов и имеющих отличную химическую структуру от ранее вводимых комбинаций фармакологических агентов, возбуждающих периферические mAChRs эндогенным АХ. Это достигалось введением пилокарпина, а эффект блокады периферических mAChRs вызывался атропином.

Поэтому в проведенных экспериментах решали вопрос о влиянии прямого М-холиномиметика пилокарпина, М-холинолитика атропина на содержание не только продуктов ПОЛ, но и субстратных составляющих ПОЛ печени – МЭЖК Арахиса, МЭЖК Эйкоза ОЛ и МЭЖК Арахиса, МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени; об изменениях содержания ТФК гомогената печени. Оценивали при этом способность пилокарпина и атропина влиять на условия, способствующие развитию ПОЛ ткани печени в период голодовых нагрузок, в частности, изменение содержания адреналина, НА гомогената печени, 2,3-ДФГ эритроцитов крови, йодного числа ОЛ, фрак-

ции СЖК печени, способность гомогената печени продуцировать АФК в период 5 дней холода.

Полученные данные сопоставляли с изменением ДК и ГП, как ОЛ печени, так и фракции СЖК, оценивали изменение содержания и МДА ткани печени.

Выяснение способности пилокарпина и атропина окислять липиды печени *in vitro* определялось в присутствии вышеперечисленных фармакологических агентов (пилокарпин, атропин) и сопоставлялись с данными, полученными *in vivo*. Пилокарпин и атропин (дозы 10 мг/кг и 1 мг/кг, соответственно) вводили животным за 30 мин до охлаждения. В проведенных сериях экспериментов действие холода оказывалось на протяжении 5 дней. Животным контрольных групп (контроль-1 и контроль-2) также за 30 мин до начала эксперимента внутривентриально вводили физиологический раствор в том же объеме, что и животным опытных групп. Результаты экспериментов представлены в таблицах 31–52.

Определяя содержание катехоламинов ткани печени, было отмечено, что, как и в предыдущих экспериментах, посвященных действию холода на протяжении 3 ч, холод 5 дней уменьшал содержание адреналина ткани печени в 4,6 раза, но приводил к росту НА на 168,1%, соответственно (табл. 31).

**Табл. 31.** Влияние пилокарпина и атропина на содержание адреналина и норадреналина (мкг/мл гомогената) в ткани печени при 5-дневном охлаждении крыс

Показатели	Адреналин	Норадреналин
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	11,6 [12,1 ÷ 10,8]	31,7 [34,1 ÷ 29,8]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	2,5 [2,8 ÷ 2,3] P <sub>2-1</sub> = 0,0197	85,0 [87,1 ÷ 82,3] P <sub>2-1</sub> = 0,0003
3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n=10	2,03 [2,2 ÷ 1,1] P <sub>3-1</sub> = 0,0001 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	36,5 [38,2 ÷ 34,2] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216
4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n=10	4,35 [4,8 ÷ 3,8] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,0197	31,3 [33,6 ÷ 29,8] P <sub>4-1</sub> = 0,631 P <sub>4-2</sub> = 0,001 P <sub>4-3</sub> = 0,119

Введение животным пилокарпина уменьшало содержание адреналина в 1,23 раза, введение же атропина приводило к противоположному эффекту – увеличению его выраженности на 74% в сравнении с данными контроля, соответственно. Оценивая изменения содержания НА периода 5 дней холодовой нагрузки, мы отмечаем только однонаправленное снижение содержания НА гомогената печени. Важно отметить, что, как и при 3-часовой холодовой нагрузке, холод в течение 5 дней снижал содержание адреналина ткани пе-

чени и приводил к росту НА. Результаты введения пилокарпина и атропина свидетельствовали, что на фоне 5 дней охлаждения животных введение пилокарпина снижало, а атропина увеличивало содержание адреналина. В то же время и пилокарпин, и атропин однонаправленно снижали содержание НА ткани печени. Следовательно, проявление реципрокности отмечали только в определении содержания адреналина ткани печени.

Оценивая изменения йодного числа ОЛ печени и фракции СЖК печени было отмечено, что 5-дневная холодовая нагрузка приводила к уменьшению содержания молекулярного йода ОЛ в 1,97 раза, а фракции СЖК печени в 1,36 раза, соответственно. Введение на этом фоне охлаждения животных пилокарпина снижало содержание молекулярного йода ОЛ печени на 17,1%, а введение атропина увеличивало его выраженность на 131,9% при сравнении с данными животных, подвергавшихся только охлаждению. Подобную тенденцию отмечали и во фракции СЖК печени – пилокарпин снижал поступление молекулярного йода в липидную фазу печени (фракция СЖК) на 79%, а атропин увеличивал поступление молекулярного йода на 9,3%, соответственно (табл. 32).

**Табл. 32.** Влияние пилокарпина и атропина на содержание молекулярного йода общих липидов (мкмоль/мг липида) фракции свободных жирных кислот печени крыс после 5 дней холодовой нагрузки

1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n=10	4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n=10
Общие липиды печени			
9,3 [8,5 ÷ 12,2]	4,7 [4,1 ÷ 5,2] P <sub>2-1</sub> = 0,00394	3,9 [3,8 ÷ 4,1] P <sub>3-1</sub> = 0,000297 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	10,9 [9,1 ÷ 12,1] P <sub>4-1</sub> = 0,149 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,00216
Фракция свободных жирных кислот печени			
59,8 [52,1 ÷ 64,1]	43,8 [40,2 ÷ 46,6] P <sub>2-1</sub> = 0,00394	9,2 [7,6 ÷ 12,3] P <sub>3-1</sub> = 0,0003 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	47,3 [39,8 ÷ 55,0] P <sub>4-1</sub> = 0,0104 P <sub>4-2</sub> = 0,423 P <sub>4-3</sub> = 0,00394

Таким образом, в данных йодного числа ОЛ и фракции СЖК печени можно отметить присутствие реципрокности – пилокарпин снижает, а атропин повышает выраженность молекулярного йода ОЛ и фракции СЖК печени. (Напомним, что йодное число трактуем как показатель изменения числа двойных связей и изменения активности холинергического звена стресс-системы, не только у интересующих нас ненасыщенных али-

фатических углеводов – ЖК, но и других классов липидов – сквалена, полициклических ненасыщенных спиртов – стерина типа холестерина и стероидных гормонов).

Помимо реципрокности, вызванной введением фармакологических агентов, работающих непосредственно с mAChRs (пилокарпин, атропин), необходимо было полученные результаты сопоставить с эффектами, возникающими при введении животным непрямого М,Н-холиномиметика неостигмина (на фоне 3 ч холодовой нагрузки) и прямого М-холиномиметика пилокарпина (на фоне 5 дней холода).

Сопоставляя данные по изменению содержания молекулярного йода ОЛ и фракции СЖК при 3-часовой холодовой нагрузке и нагрузке холодом на протяжении 5 дней, можно было отметить, что холод в течение 3 ч увеличивает, а действие холода 5 дней уменьшает содержание молекулярного йода ОЛ и фракции СЖК печени. Эффекты неостигмина на фоне 3 ч холода и эффекты пилокарпина периода 5 дней холода по направлению совпадали – отмечали уменьшение поступления молекулярного йода, как в ОЛ, так и во фракцию СЖК печени.

Безусловно, формирование теплового баланса у животных периода холодовых нагрузок и возникающего напряжения периферической стресс-системы требует обязательного нахождения в ткани печени как эстерифицированных, так и неэстерифицированных PUFAs, своим присутствием создающих условия для возникновения ПОЛ [22; 24; 67; 68; 115; 345]. При этом необходимо было учитывать и способность к изменению расположения двойных связей у ненасыщенных компонентов липидных субстратов печени, трактуемых нами как подготовительный этап развития ПОЛ печени [272; 316; 445]. Поэтому влияние пилокарпина и атропина на изменения содержания trans-изомеров ЖК липидов печени периода 5 дней холода несомненно вызывало интерес.

Так, на примере cis- и trans-изомеров ЖК  $\Delta 9,12 C_{18:2}$  линолевой, диеновой было показано, что если 5-дневная холодовая нагрузка приводила к уменьшению содержания cis-изомеров ЖК, то этот же вид нагрузки приводил к увеличению содержания trans-изомеров ЖК ОЛ печени в 1,3 раза, соответственно (табл. 33).

**Табл. 33.** Содержание cis- и trans-изомеров ЖК  $\Delta 9,12 C_{18:2}$  линолевой, диеновой (мкг/мл гомогената) в общих липидах печени после 5 дней охлаждения крыс

ЖК $\Delta 9,12 C_{18:2}$ - линолевая, диеновая	1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10
Cis-изомеры	4574,6 [4215,6 ÷ 4876,7]	3530,4 [3413,7 ÷ 3891,7] $P_{2-1} = 0,00395$
Trans-изомеры	14,3 [13,1 ÷ 16,7]	18,9 [17,5 ÷ 20,1] $P_{2-1} = 0,00216$

Введение животным пилокарпина и атропина в период 5 дней охлаждения не приводило к проявлению реципрокности при определении содержания trans-изомеров ЖК ОЛ печени (табл. 34).

**Табл. 34.** Введение пилокарпина и атропина на содержание trans-изомеров ЖК  $\Delta 9,12 C_{18:2}$  линолевой, диеновой в общих липидах печени (мкг/мл гомогената) после 5 дней охлаждения крыс

ЖК $C_{18:2} \Delta 9,12$ линолевая, диеновая	1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n=10	4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n=10
Trans-изомеры	14,284 [13,112 ÷ 16,781]	18,911 [17,567 ÷ 20,112] $P_{2-1} = 0,00216$	5,252 [3,514 ÷ 7,918] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,00216$	0,579 [0,578 ÷ 1,116] $P_{4-1} = 0,0197$ $P_{4-2} = 0,0001$ $P_{4-3} = 0,00216$

Действие холода 5 дней уменьшало выраженность cis-изомеров и во фракции СЖК печени, но при этом отмечали увеличение содержания trans-изомеров ЖК (табл. 35).

**Табл. 35.** Содержание cis- и trans-изомеров ЖК  $\Delta 9,12 C_{18:2}$  линолевой, диеновой фракции СЖК печени (мкг/мл гомогената) после 5 дней охлаждения крыс

ЖК $\Delta 9,12 C_{18:2}$ линолевая, диеновая	1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10
Cis-изомеры	4067,8 [3516,7 ÷ 4818,2]	667,9 [513,9 ÷ 922,1] $P_{2-1} = 0,00394$
Trans-изомеры	13,951 [11,108 ÷ 17,131]	23,340 [22,517 ÷ 26,328] $P_{2-1} = 0,00216$

Но реципрокность проявлялась при введении животным пилокарпина и атропина и при оценке содержания trans-изомеров ЖК фракции СЖК печени (табл. 36).

**Табл. 36.** Влияние пилокарпина и атропина на содержание trans-изомеров ЖК  $C_{18:2} \Delta 9,12$  линолевой, диеновой фракции СЖК печени (мкг/мл гомогената) после 5 дней охлаждения крыс

ЖК семейства $\omega-6 C_{18:2} \Delta 9,12$ , линолевая, диеновая	1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n=10	4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n=10
Trans-изомеры	13,951 [17,131 ÷ 11,108]	23,340 [26,328 ÷ 22,517] $P_{2-1} = 0,00216$	124,9 [141,6 ÷ 105,2] $P_{3-1} = 0,0003$ $P_{3-2} = 0,00394$	21,213 [22,415 ÷ 19,217] $P_{4-1} = 0,004$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00394$

Таким образом, на примере ЖК C<sub>18:2</sub> Δ9,12 линолевой, диеновой нами показано, что холодовая нагрузка 5 дней приводила к уменьшению содержания cis-изомеров, как в ОЛ, так и во фракции СЖК печени, но увеличивала содержание trans-изомеров ЖК ОЛ и фракции СЖК печени. Проявление же феномена реципрокности отмечали только во фракции СЖК печени и при оценке содержания trans-изомеров ЖК.

Сравнивая полученные данные с данными введения животным неостигмина на фоне 3-часовой холодовой нагрузки, можно было отметить следующее. Действие холода, как на протяжении 3 ч, так и на протяжении 5 дней приводило к увеличению содержания trans-изомеров ЖК ОЛ печени и trans-изомеров ЖК фракции СЖК печени. Введение неостигмина в период 3 ч холода и введение пилокарпина на протяжении 5 дней холода приводили к однонаправленному эффекту – увеличению содержания trans-изомеров ЖК, причем неостигмина в ОЛ печени, а пилокарпина – во фракции СЖК.

Как мы уже отмечали в предыдущей главе, в период кратковременной холодовой нагрузки (3 ч) наиболее активно подвергаются изменениям липиды фракции СЖК печени. Подвергая животных 5-дневной холодовой нагрузке, отмечали, что во фракции СЖК наиболее динамичными липидными структурами печени являлись ЖК семейства ω-6 – МЭЖК Арахиса и ЖК семейства ω-3 – МЭЖК Эйкоза и ЖК семейства ω-9 – МЭЖК DGLA. При введении животным пилокарпина и атропина 5 дней охлаждения феномен реципрокности отмечали только при оценке содержания МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса и МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени.

Таким образом, результаты экспериментов по определению МЭЖК семейства C<sub>20</sub> (МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса, МЭЖК Эйкоза) свидетельствовали, что холодовая нагрузка периода 5 дней снижала содержание МЭЖК в ОЛ печени, за исключением МЭЖК Эйкоза – здесь отмечали увеличение МЭЖК Эйкоза в 1,49 раза (табл. 37).

**Табл. 37.** Влияние пилокарпина и атропина на содержание метиловых эфиров жирных кислот семейства C<sub>20</sub> (МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса, МЭЖК Эйкоза) общих липидов печени (мкг/мл гомогената) после 5 дней охлаждения крыс

Показатели	МЭЖК Δ11,14,17 C <sub>20:3</sub> эйкозатриеновой ЖК (digomo-γ-linolenic acid), (ЖК DGLA)	МЭЖК Δ5,8,11,14 C <sub>20:4</sub> эйкозатетраено- вой ЖК (ЖК Арахиса)	МЭЖК Δ5,8,11,14,17 C <sub>20:5</sub> эйкозапентаено- вой ЖК (ЖК Эйкоза)
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n = 10	6155,6 [5906,2 ÷ 6513,2]	5,021 [4,724 ÷ 5,627]	77,112 [69,568 ÷ 91,081]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n = 10	5376,1 [5004,9 ÷ 5806,2] P <sub>2-1</sub> = 0,00394	4,285 [3,807 ÷ 4,629] P <sub>2-1</sub> = 0,00394	115,1 [100,2 ÷ 132,16] P <sub>2-1</sub> = 0,00394

3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n = 10	2406,1 [2201,2 ÷ 3005,5] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216	0,414 [0,105÷1,112] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216	45,151 [38,962÷58,182] P <sub>3-1</sub> = 0,00216 P <sub>3-2</sub> = 0,0197
4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n = 10	2966,3 [2802,8 ÷ 3305,2] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,179	1,512 [0,107÷2,189] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,004	3,55 [1,608÷8,904] P <sub>3-1</sub> = 0,0197 P <sub>3-2</sub> = 0,0001 P <sub>4-3</sub> = 0,00216

Явление же реципрокности при введении животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней холодовой нагрузки нами отмечалось только во фракции СЖК печени. Так, введение животным пилокарпина снижало содержание МЭЖК DGLA фракции СЖК печени на 38,6%, а введение атропина повышало выраженность МЭЖК DGLA на 124,8%; пилокарпин на 66,3% увеличивал содержание МЭЖК Арахиса, а атропин на 5,9% снижал МЭЖК Арахиса, соответственно.

В оценке содержания МЭЖК Эйкоза фракции СЖК полученные нами данные трактуются, как проявление реципрокности, – пилокарпин снижал содержание МЭЖК Эйкоза до уровня данных группы животных контроль-2, а атропин приводил к противоположному эффекту – повышению содержания МЭЖК Эйкоза на 181,1% при сравнении с группой животных контроль-2, соответственно (табл. 38).

**Табл. 38.** Влияние пилокарпина и атропина на содержание метиловых эфиров жирных кислот семейства C<sub>20</sub> (МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса, МЭЖК Эйкоза) фракции СЖК печени (мкг/мл гомогената) после 5 дней охлаждения

Показатели	МЭЖК Δ11,14,17 C <sub>20:3</sub> эйкозатриеновой ЖК (digomo-γ-linolenic acid), (ЖК DGLA)	МЭЖК Δ5,8,11,14 C <sub>20:4</sub> эйкозатетраено- вой ЖК (ЖК Арахиса)	МЭЖК Δ5,8,11,14,17 C <sub>20:5</sub> эйкозапентаено- вой ЖК (ЖК Эйкоза)
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n = 10	1946,6 [1872,4 ÷ 2110,3]	59,6 [48,1 ÷ 64,7]	59,1 [56,7 ÷ 66,7]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n = 10	480,6 [403,2 ÷ 512,2] P <sub>2-1</sub> = 0,0197	32,1 [30,6 ÷ 36,1] P <sub>2-1</sub> = 0,00216	31,8 [29,9 ÷ 37,8] P <sub>2-1</sub> = 0,00394
3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n = 10	295,3 [201,8 ÷ 350,2] P <sub>3-1</sub> = 0,0001 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	53,4 [48,7 ÷ 64,6] P <sub>3-1</sub> = 0,240 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	37,4 [36,1 ÷ 39,2] P <sub>3-1</sub> = 0,00216 P <sub>3-2</sub> = 0,406

Окончание таблицы 38

4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n = 10	1080,4 [900,2 ÷ 1326,7] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,0197$	30,2 [27,7 ÷ 32,5] $P_{4-1} = 0,00216$ $P_{4-2} = 0,0782$ $P_{4-3} = 0,00394$	89,4 [78,5 ÷ 96,8] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,0003$ $P_{4-3} = 0,00216$
--	--	---	---

Таким образом, сравнивая содержание МЭЖК семейства  $C_{20}$  (МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса, МЭЖК Эйкоза) ОЛ и МЭЖК семейства  $C_{20}$  фракции СЖК печени на фоне 5 дней действия холода с данными, полученными при введении животным неостигмина в период 3 ч холодовой нагрузки, можно отметить следующее. Если, холод в течение 3 ч уменьшал выраженность МЭЖК Арахиса фракции СЖК печени и увеличивал там же содержание МЭЖК Эйкоза, то 5-дневная холодовая нагрузка приводила к снижению всех упомянутых нами МЭЖК  $C_{20}$  ОЛ печени, за исключением МЭЖК Эйкоза и к снижению всех определяемых МЭЖК семейства  $C_{20}$  (МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса, МЭЖК Эйкоза) во фракции СЖК печени. Эффекты пилокарпина на протяжении 5 дней охлаждения животных и эффекты неостигмина периода кратковременной холодовой нагрузки (3 ч) по направлению совпадали – пилокарпин увеличивал выраженность МЭЖК Арахиса и неостигмин увеличивал содержание МЭЖК Арахиса, но неостигмин в большей степени увеличивал МЭЖК Эйкоза во фракции СЖК печени.

Безусловно, в работе механизмов формирования ПОЛ (на фоне холода) наряду с PUFA, определяющим фактором развития ПОЛ является присутствие ТФК с определённой концентрацией кислорода в тканевой среде, что и создаёт парциальное напряжение кислорода [65; 425].

Проведенные эксперименты показали, что введение пилокарпина и атропина на фоне 5 дней охлаждения животных приводило к проявлению реципрокности при оценке содержания ТФК гомогената печени. Так, если на 3-ей минуте эксперимента отмечали снижение содержания ТФК на 3,3% в группе животных контроль-2, то в группе животных с введением пилокарпина отмечался рост ТФК на 10,7% и снижение содержания ТФК в группе животных с введением атропина на 2,1%, соответственно. К 30-ой минуте эксперимента всё складывалось несколько иначе – в группе животных контроль-2 (холод) отмечали увеличение содержания ТФК на 49,6%; в группе животных с введением пилокарпина определяли снижение ТФК на 7,6%, а в группе животных с введением атропина отмечали рост содержания кислорода на 20,6%, соответственно (табл. 39).

Подводя итог данному разделу экспериментов, можно отметить, что мы отмечали проявление реципрокности при определении содержания ТФК гомогената печени, как на 3-ей минуте, так и на 30-ой минуте экспериментов при введении животным пилокарпина и атропина.

**Табл. 39.** Влияние пилокарпина и атропина на содержание триплетной формы кислорода гомогената печени (ммоль  $O_2$ /мл гомогената) на 5-й день охлаждения крыс

Показатели	Триплетная форма кислорода на 3-й минуте эксперимента	Триплетная форма кислорода на 30-й минуте эксперимента
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	287,2 [285,3 ÷ 289,1]	309,5 [307,3 ÷ 311,6]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	277,8 [275,8 ÷ 279,3] $P_{2-1} = 0,00394$	463,4 [456,1 ÷ 471,5] $P_{2-1} = 0,00216$
3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n=10	307,8 [304,2 ÷ 311,2] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,0003$	428,4 [400,5 ÷ 442,5] $P_{3-1} = 0,000297$ $P_{3-2} = 0,00394$
4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n=10	272,2 [270,1 ÷ 273,6] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00395$	559,0 [534,8 ÷ 581,5] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00297$

Но описывая материал, определяющий способность гомогената печени продуцировать АФК, нами не отмечалось проявление реципрокности при введении животным пилокарпина и атропина, хотя отмечали, что холод периода 5 дней увеличивает способность гомогената печени продуцировать АФК в 1,3 раза (табл. 40).

Таким образом, сопоставляя данные по определению ТФК, АФК гомогената печени периода 5 дней холодовой нагрузки и введении животным пилокарпина и атропина, можно отметить следующие проявления. Проявление реципрокности были выявлены при определении ТФК как на 3-ей, так и на 30-ой минуте экспериментов, но данный феномен не отмечали при определении способности гомогената печени продуцировать АФК в присутствии пилокарпина и атропина, хотя холодовая нагрузка вызывала увеличение способности гомогената печени продуцировать АФК.

**Табл. 40.** Влияние пилокарпина и атропина на способность гомогената печени продуцировать активные формы кислорода ( $10^{-6}$  ампер/мл гомогената) после 5 дней охлаждения крыс

Показатели	Активные формы кислорода
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n = 10	7,69 [6,85 ÷ 8,54]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n = 10	10,01 [9,70 ÷ 10,51] $P_{2-1} = 0,00175$
3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n = 10	9,03 [8,09 ÷ 9,93] $P_{3-1} = 0,00601$ $P_{3-2} = 0,00127$

Окончание таблицы 40

4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n = 10	9,609 [9,48 ÷ 9,73] P <sub>4-1</sub> = 0,00174 P <sub>4-2</sub> = 0,00601 P <sub>4-3</sub> = 0,277
--	---

Сопоставляя данные полученного материала с результатами введения животным неостигмина периода 3 ч холода, можно отметить, что как 3-часовая, так и 5-дневная холодовая нагрузка увеличивала способность гомогената печени животных продуцировать АФК; введение неостигмина на фоне 3 ч холода способствовало росту АФК, введение же пилокарпина – нет, хотя в том и другом случае отмечали выраженные периферические М-холиномиметические эффекты – обильную саливацию, бронхоспазм, непроизвольное мочеиспускание, дефекацию [2].

Получение противоположных по направлению эффектов в оценке содержания ТФК, способности гомогената печени продуцировать АФК потребовало от нас проведения экспериментов и по определению содержания 2,3-ДФГ эритроцитов крови и введении животным пилокарпина и атропина. Данные экспериментов свидетельствовали, что охлаждение животных периода 5 дней увеличивало содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови в 1,23 раза. Введение животным на этом фоне охлаждения пилокарпина способствовало уменьшению содержания 2,3-ДФГ эритроцитов крови на 33,7%, а введение атропина увеличивало этот показатель на 14,1%, соответственно (табл. 41).

**Табл. 41.** Влияние пилокарпина и атропина на содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови (мкмоль Р/мл эритроцитов) после 5 дней охлаждения крыс

Показатели	2,3-ДФГ
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n = 10	12,645 [11,695 ÷ 12,82]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n = 10	15,585 [15,06 ÷ 16, 117] P <sub>2-1</sub> = 0,00395
3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n = 10	11,651 [10,861 ÷ 12,290] P <sub>2-1</sub> = 0,0249 P <sub>3-2</sub> = 0,00394
4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n = 10	17,782 [16,370 ÷ 18,279] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,00394

Подводя итог данным по содержанию ТФК, способности гомогената печени продуцировать АФК и данные по содержанию 2,3-ДФГ эритроцитов крови, можно отметить следующее. Если при кратковременной холодовой

нагрузке (3 ч) и действии холода периода 5 дней отмечали увеличение содержания ТФК гомогената печени и рост способности гомогенатом печени продуцировать АФК, а также снижение содержания 2,3-ДФГ эритроцитов крови после 3-часовой холодовой нагрузки, то после 5 дней холода содержание 2,3-ДФГ эритроцитов возрастало, и феномен реципрокности присутствовал при определении содержания ТФК гомогената печени, 2,3-ДФГ эритроцитов крови, и он был связан с введением животным пилокарпина и атропина. Реципрокность же в способности гомогената печени продуцировать АФК на фоне введения животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней охлаждения нами не была отмечена.

Сопоставляя полученные данные с результатами, описанными при введении неостигмина периода 3 ч действия холода, можно отметить, что неостигмин на фоне 3-часового охлаждения животных уменьшал содержание ТФК гомогената печени, снижал содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови, но приводил к увеличению способности гомогената печени продуцировать АФК. Введение животным пилокарпина периода 5 дней холодовой нагрузки также приводило к уменьшению содержания ТФК гомогената печени, снижало содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови, но способность гомогената печени увеличивать продукцию АФК нами не отмечалась.

Безусловно, способность ткани печени продуцировать АФК предполагает вероятность возникновения и феномена неспаренной валентности аллильно и бис-аллильно расположенных метиленовых групп PUFAs [86; 391; 392; 411], а с присутствием ТФК тканевой среды печени мы связываем возможность делокализации двойных связей в ненасыщенных компонентах липидов печени с последующим формированием ДК [241].

Поэтому ставя задачу в определении ДК и введении животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней холода, мы получали следующие результаты. Если в группе животных контроль-2 (холод) содержание ДК снижалось в 1,16 раза при сравнении с животными группы контроль-1 (интактные), то введение животным пилокарпина увеличивало содержание ДК на 91,6%, соответственно. Атропин же снижал содержание ДК ОЛ до уровня животных, подвергавшихся только охлаждению, и не вызывал статистически значимых различий при оценке содержания ДК ОЛ печени при сравнении между группами животных контроль-2 и опыт-2 (табл. 42).

**Табл. 42.** Влияние пилокарпина и атропина на содержание диеновых конъюгатов общих липидов печени (нмоль/мг липида) после 5 дней охлаждения крыс

Показатели	Диеновые конъюгаты
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n = 10	119,4 [105,8 ÷ 130,1]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n = 10	102,5 [83,6 ÷ 108,3] P <sub>2-1</sub> = 0,0168

Окончание таблицы 42

3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n = 10	196,4 [107,7 ÷ 209,8] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,0003
4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n = 10	107,8 [96,1 ÷ 128,1] P <sub>4-1</sub> = 0,149 P <sub>4-2</sub> = 0,0926 P <sub>4-3</sub> = 0,0241

Определение же содержания ДК фракции СЖК печени при введении животным пилокарпина и атропина периода 5 дней холода показывало проявление значимых различий при оценке содержания ДК между группами животных контроль-2 и опыт-2 (табл. 43).

**Табл. 43.** Влияние пилокарпина и атропина на содержание диеновых конъюгатов фракции свободных жирных кислот печени (нмоль/мг липида) после 5 дней охлаждения крыс

Показатели	Диеновые конъюгаты
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n = 10	19,9 [18,2 ÷ 22,2]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n = 10	35,8 [32,7 ÷ 38,7] P <sub>2-1</sub> = 0,00394
3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n = 10	40,9 [39,2 ÷ 42,9] P <sub>3-1</sub> = 0,0197 P <sub>3-2</sub> = 0,00394
4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n = 10	15,2 [13,4 ÷ 16,7] P <sub>4-1</sub> = 0,00216 P <sub>4-2</sub> = 0,0197 P <sub>4-3</sub> = 0,0001

Таким образом, если холод 5 дней снижал содержание ДК ОЛ печени, а во фракции СЖК увеличивал ДК в 1,79 раза, то введение при данном режиме охлаждения животных пилокарпина увеличивало содержание ДК ОЛ, ДК фракции СЖК печени. Введение же животным атропина вызывало статистически недостоверное снижение ДК ОЛ печени, но во фракции СЖК печени атропин в предложенной дозе вызывал статистически достоверное снижение ДК.

Сопоставляя данные по содержанию ДК и введению животным пилокарпина периода 5 дней охлаждения с данными по ДК при введении неостигмина на фоне 3-часового холода важно отметить следующее: если действие холода на протяжении 3 ч увеличивало содержание ДК ОЛ печени, то введение при данном режиме охлаждения животных неостигмина уменьшало ДК ОЛ; если холод в течение 5 дней снижал ДК ОЛ, то введение пилокарпина на фоне 5 дней холода увеличивало содержание ДК ОЛ печени.

Напоминаем, что вся кинетика формирования продуктов ПОЛ, описанная в литературе, предопределяет наряду с формированием ДК и изменением содержания ТФК, проявление и изменений ПР [426] с дальнейшим трансформированием его в ГП через донатирование ПР (перокси-радикалу)  $H^+$  из  $\alpha$ -токоферола липидной фазы мембран клетки [50; 371]. Поэтому нами в определении содержания  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени и введении животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней холодовой нагрузки придавалось большое значение.

Определяя  $\alpha$ -токоферол ОЛ печени при введении животным пилокарпина и атропина, было отмечено проявление реципрокности. Так, если холодовая нагрузка 5 дней снижала содержание  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени в 2,12 раза, то введение пилокарпина животным увеличивало выраженность  $\alpha$ -токоферола на 23,3%. Введение атропина снижало его содержание на 31,6%, соответственно (табл. 44).

**Табл. 44.** Влияние пилокарпина и атропина на содержание  $\alpha$ -токоферола общих липидов печени (мкг/мг липида) после 5 дней охлаждения крыс

Показатели	$\alpha$ -Токоферол
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n = 10	6,785 [5,6 ÷ 7,4]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n = 10	3,19 [2,86 ÷ 3,7] $P_{2-1} = 0,00394$
3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n = 10	3,935 [3,75 ÷ 4,26] $P_{3-1} = 0,00216$ $P_{3-2} = 0,00394$
4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n = 10	2,185 [1,22 ÷ 2,71] $P_{4-1} = 0,00216$ $P_{4-2} = 0,00394$ $P_{4-3} = 0,00216$

Сравнивая полученные данные с результатами введения неостигмина на фоне 3 ч холодовой нагрузки, можно было отметить следующее: 3-часовой холод увеличивал выраженность  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени, неостигмин же на фоне 3 ч холода уменьшал эту выраженность.

У животных, подвергавшихся 5-дневной холодовой нагрузке, снижалось содержание  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени, введение же пилокарпина на фоне данного режима охлаждения животных увеличивало содержание  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени, а введение атропина уменьшало его.

Понимая, что изменение содержания  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени связано с донатированием  $H^+$  пероксильного радикала и это, по данным литературы, приводит к дальнейшей трансформации пероксильного радикала в ГП [406; 407; 408], мы ставили задачу определения изменений содержания ГП ОЛ печени при введении животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней

холодовой нагрузки. Оценивая изменения содержания ГП ОЛ печени, получали следующие данные: действие холода периода 5 дней приводило к снижению ГП ОЛ печени в 1,18 раза. Введение животным пилокарпина приводило к снижению ГП ОЛ на 14,5%, а введение атропина приводило к противоположному эффекту – увеличению ГП ОЛ на 22,7% в сравнении с данными группы животных контроль-2, соответственно (табл. 45).

**Табл. 45.** Влияние пилокарпина и атропина на содержание гидроперекисей общих липидов печени (нмоль /мг липида) после 5 дней охлаждения крыс

Показатели	Гидроперекиси
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n = 10	5,525 [5,202 ÷ 5,713]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n = 10	4,65 [4,18 ÷ 4,762] P <sub>2-1</sub> = 0,00394
3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n = 10	3,979 [3,89 ÷ 4,095] P <sub>3-1</sub> = 0,0003 P <sub>3-2</sub> = 0,00394
4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n = 10	5,706 [5,608 ÷ 5,841] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,297 P <sub>4-3</sub> = 0,00216

Таким образом, данные по содержанию ГП ОЛ печени при введении пилокарпина и атропина периода 5 дней охлаждения животных свидетельствуют о проявлении реципрокности. Сопоставляя данные по изменению ГП ОЛ печени периода 5 дней холодовой нагрузки и введении животным пилокарпина и атропина с данными по содержанию ГП ОЛ печени и введении неостигмина на фоне 3-часовой холодовой нагрузки, необходимо было отметить следующее. Холод в течении 3 ч так же, как и холодовая нагрузка периода 5 дней, снижали выраженность ГП ОЛ печени, пилокарпин так же, как и неостигмин, увеличивал снижение ГП ОЛ печени на фоне как кратковременного (3 ч), так и длительного (5 дней) охлаждения.

Суммируя полученные данные по содержанию  $\alpha$ -токоферола и ГП ОЛ печени на фоне 5 дней охлаждения животных можно отметить, что пилокарпин увеличивал содержание  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени, но уменьшал ГП ОЛ печени. Атропин снижал содержание  $\alpha$ -токоферола и увеличивал выраженность ГП ОЛ печени. Необходимо также подчеркнуть, что введение животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней холода приводило к проявлению реципрокности и при оценке содержания ГП фракции СЖК печени. Так, если 5-дневная холодовая нагрузка увеличивала содержание ГП фракции СЖК печени в 1,7 раза, то введение животным пилокарпина увеличивало содержание ГП фракции СЖК на 14,1%, введение же жи-

вотным атропина снижало выраженность ГП фракции СЖК на 43,6% при сравнении с данными животных группы контроль-2, соответственно (табл. 46).

**Табл. 46.** Влияние пилокарпина и атропина на содержание гидроперекисей фракции свободных жирных кислот печени (нмоль/мг липида) после 5 дней охлаждения крыс

Показатели	Гидроперекиси
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n = 10	0,891 [0,796 ÷ 0,911]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n = 10	1,551 [1,391 ÷ 1,613] P <sub>2-1</sub> = 0,00394
3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n = 10	1,769 [1,69 ÷ 2,032] P <sub>3-1</sub> = 0,00143 P <sub>3-2</sub> = 0,00394
4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n = 10	0,875 [0,492 ÷ 1,219] P <sub>4-1</sub> = 0,00216 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,00143

Определение короткоцепочечного альдегида – МДА и введение животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней холода показало, что холодовая нагрузка приводила к увеличению содержания МДА в 1,28 раза при сравнении с данными интактными животными (группа животных контроль-1). Введение пилокарпина на фоне данного режима охлаждения животных увеличивало выраженность МДА на 77,6%, а при введении животным атропина содержание МДА определялось на уровне животных группы контроль-2 (табл. 47).

**Табл. 47.** Влияние пилокарпина и атропина на содержание малонового альдегида гомогената печени (нмоль /мл гомогената) после 5 дней охлаждения крыс

Показатели	Малоновый диальдегид
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n = 10	1,025 [0,903 ÷ 1,231]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n = 10	1,322 [1,216 ÷ 1,572] P <sub>2-1</sub> = 0,00648
3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n = 10	2,348 [2,01 ÷ 2,473] P <sub>3-1</sub> = 0,0004 P <sub>3-2</sub> = 0,00394
4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n = 10	1,361 [1,306 ÷ 1,586] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,297 P <sub>4-3</sub> = 0,00216

По итогам данного раздела экспериментов можно сделать следующее заключение: при определении МДА ткани печени и введении животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней холода проявление феномена реципрокности остаётся под вопросом. Сопоставляя полученные результаты с данными, показывающими изменения МДА гомогената печени на фоне 3-часовой холодовой нагрузки и введении животным неостигмина, можно отметить следующее: если 3-часовая холодовая нагрузка не увеличивала содержание МДА печени, то холод в течении 5 дней приводил к росту содержания МДА, а при введении животным неостигмина на фоне 3-часовой холодовой нагрузки и введении животным пилокарпина на фоне 5 дней холода отмечали однонаправленность – неостигмин и пилокарпин на фоне холода увеличивали содержание МДА ткани печени.

Понимая, что отсутствие реципрокности при определении МДА ткани печени и введении животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней холода не позволяет нам высказать предположение о возможном влиянии периферических mAChRs метаботропных G-белков плазматической мембраны гепатоцитов на один из определяемых альдегидных продуктов ПОЛ печени – МДА, то нами были проведены эксперименты по определению содержания продуктов ПОЛ печени (ДК ОЛ, ГП ОЛ, МДА водной фазы) в МЭРГ и введении животным пилокарпина и атропина периода 5 дней охлаждения. Были получены данные, свидетельствующие о проявлении реципрокности как при определении ДК ОЛ, ГП ОЛ, так и МДА водной фазы МЭРГ, соответственно (табл. 48).

**Табл. 48.** Влияние пилокарпина и атропина на содержание диеновых конъюгатов, гидроперекисей в общих липидах микросом печени (нмоль/мг липида), малонового диальдегида (нмоль/мл гомогената) в водной фазе микросом печени после 5 дней охлаждения крыс

Показатели	Диеновые конъюгаты	Гидроперекиси	Малоновый диальдегид
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n = 10	223,5 [200,3 ÷ 245,6]	8,26 [7,905 ÷ 8,901]	2,602 [2,212 ÷ 2,836]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n = 10	156,1 [150,2 ÷ 174,8] P <sub>2-1</sub> = 0,009	6,421 [6,129 ÷ 7,084] P <sub>2-1</sub> = 0,00394	3,01 [2,815 ÷ 3,114] P <sub>2-1</sub> = 0,00648
3-ья группа, опыт-1 (холод + пилокарпин 10 мг/кг), n = 10	183,4 [174,1 ÷ 189,1] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216	7,307 [6,642 ÷ 8,635] P <sub>3-1</sub> = 0,109 P <sub>3-2</sub> = 0,0104	3,746 [3,256 ÷ 3,986] P <sub>3-1</sub> = 0,00754 P <sub>3-2</sub> = 0,00394
4-ая группа, опыт-2 (холод + атропин 1 мг/кг), n = 10	138,0 [126,1 ÷ 147,8] P <sub>4-1</sub> = 0,00794 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,00394	4,772 [3,076 ÷ 5,863] P <sub>4-1</sub> = 0,0003 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,00876	2,262 [2,109 ÷ 2,656] P <sub>4-1</sub> = 0,109 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,0003

Таким образом, по результатам экспериментов, определяющих содержание ДК ОЛ, ГП ОЛ печени и определяющих содержание ДК ОЛ, ГП ОЛ МЭРГ, можно отметить присутствие реципрокности, только при определении ГП ОЛ печени и при оценке содержания продуктов ПОЛ МЭРГ (ДК ОЛ МЭРГ; ГП ОЛ МЭРГ; МДА водной фазы МЭРГ). Возникновение реципрокности в продуктах ПОЛ фракции СЖК печени мы пока не принимаем во внимание.

Сопоставляя данные содержания МДА ткани печени и содержания МДА водной фазы МЭРГ, можно отметить проявление реципрокности только при определении МДА водной фазы МЭРГ.

#### **4.7. Заключение о влиянии пилокарпина и атропина на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ, влияние на изменение условий, способствующих развитию ПОЛ печени *in vivo* на фоне 5 дней охлаждения крыс**

Обобщая экспериментальные данные, связанные с введением животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней холодовой нагрузки, можно было отметить следующее: холодовая нагрузка периода 5 дней приводила к уменьшению содержания адреналина, но к росту НА. Введение пилокарпина и атропина при выбранном режиме охлаждения животных сопровождалось проявлением реципрокности только при оценке содержания адреналина. Определяя йодное число ОЛ фракции СЖК печени отмечали снижение поступления молекулярного йода в вышеперечисленные липидные фазы периода 5 дней холодовой нагрузки. Введение животным пилокарпина и атропина приводило к проявлению реципрокности как в ОЛ, так и во фракции СЖК печени.

Оценивая способность изменения положения двойных связей у ненасыщенных компонентов липидов печени было определено, что холодовая нагрузка 5 дней приводила к изменению содержания изомеров ЖК – происходило уменьшение содержания *cis*-изомеров ЖК ОЛ и фракции СЖК, но отмечался рост содержания *trans*-изомеров ЖК ОЛ и *trans*-изомеров ЖК фракции СЖК печени (напоминаем, на примере ЖК  $\Delta^9,12$  C<sub>18,2</sub> линолевой, диеновой).

Пилокарпин и атропин вызывали проявление реципрокности при оценке содержания *trans*-изомеров ЖК только во фракции СЖК печени.

Давая оценку изменениям содержания МЭЖК C<sub>20</sub> (МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахид, МЭЖК Эйкоза) было отмечено, что холод 5 дней приводил к количественному уменьшению содержания МЭЖК DGLA ОЛ, МЭЖК Арахид ОЛ печени и приводил к уменьшению содержания МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахид

хи и МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени. Вводя животным пилокарпин и атропин на фоне 5 дней холода, отмечали проявление реципрокности при оценке содержания МЭЖК DGLA и МЭЖК Арахидной кислоты только во фракции СЖК печени. Реципрокность при оценке содержания МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени остаётся для нас под вопросом.

Сопоставляя способность гомогената печени в продуцировании АФК и определяя содержание ТФК, было отмечено, что гомогенат печени животных, подвергавшихся только холодовой нагрузке способен показывать снижение содержания ТФК на 3-ей минуте эксперимента и повышать его к 30-ой минуте. Введение животным пилокарпина и атропина периода 5 дней холода приводило к проявлению реципрокности как к 3-ей, так и к 30-ой минуте экспериментов. Важно отметить, что введение пилокарпина, атропина животным на фоне 5 дней охлаждения не приводило к проявлению феномена реципрокности в оценке способности гомогената печени продуцировать АФК.

Определяя, в контексте полученных данных, содержание ТФК гомогената печени, способности гомогената печени продуцировать АФК было изучено содержание и 2,3-ДФГ эритроцитов крови. Холодовая нагрузка 5 дней увеличивала содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови, введение животным пилокарпина и атропина приводило к проявлению реципрокности.

Оценивая изменение ДК ОЛ, ДК фракции СЖК печени было отмечено, что холод 5 дней уменьшал содержание ДК ОЛ печени, но увеличивал выраженность ДК фракции СЖК. Проявление реципрокности на фоне данного режима холодовой нагрузки и введения животным пилокарпина и атропина при определении ДК отмечали только во фракции СЖК.

Трактую содержание  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени, как донатора  $H^+$  для перехода ДК ЖК из состояния ПР в состояние ГП, мы выявили, что 5-дневная холодовая нагрузка снижает содержание  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени. Введение животным пилокарпина и атропина на этом фоне охлаждения приводило к проявлению феномена реципрокности при оценке содержания  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени.

Давая оценку содержанию ГП ОЛ, фракции СЖК липидов печени, необходимо было отметить, что 5-дневная холодовая нагрузка, оказываемая животным, приводила к снижению ГП ОЛ и повышению ГП фракции СЖК печени. И в той и другой фракциях липидов печени присутствовала реципрокность, вызываемая введением животным пилокарпина и атропина.

Определяя МДА ткани печени, отмечали увеличение содержания МДА после 5 дней холода, в отличие от данного вида нагрузки, создаваемой на протяжении 3 ч. Изменения содержания МДА и введении животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней охлаждения нами как реципрокность не трактуется – пилокарпин увеличивал содержание МДА, а атропин (1 мг/кг) снижал выраженность МДА до уровня группы животных, подвергавшихся только охлаждению.

В то же время проявление реципрокности нами установлена при определении содержания МДА в водной фазе МЭРГ. Так, если холод в течение 5 дней увеличивал содержание МДА в МЭРГ, то введение на этом фоне охлаждения животных пилокарпина и атропина в тех же дозах приводило к проявлению реципрокности. Присутствие реципрокности нами установлено и при оценке содержания ДК, ГП определяемых в ОЛ МЭРГ.

Таким образом, созданием холодового стресса у животных мы индуцировали ПОЛ печени. Введением прямых фармакологических агентов пилокарпина и атропина нами было обнаружено проявление феномена реципрокности при определении содержания продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени и была определена реципрокность в условиях, способствующих развитию ПОЛ печени.

Но по-прежнему оставался нерешённым вопрос о возможном влиянии на выраженность продуктов ПОЛ печени химических элементов, входящих в структуры молекул пилокарпина и атропина и способных индуцировать перемнную валентность в перечисленных фармакологических агентах под влиянием редокс-цепей ткани печени. Для решения возникших вопросов нами были проведены эксперименты индуцирования ПОЛ микросом печени неферментативными и ферментативными механизмами *in vitro* с присутствием в инкубационной среде выше перечисленных фармакологических препаратов.

#### **4.8. Результаты индуцирования ПОЛ микросом печени *in vitro* неферментативными (аскорбатзависимыми) и ферментативными (NADP•H-зависимыми) механизмами и присутствии пилокарпина или атропина**

В предыдущем разделе работы, связанном с введением М-холиномиметика пилокарпина и М-холиноблокатора атропина, мы решали не только вопрос о возникновении реципрокности при оценке содержания продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени, не только о реципрокности при оценке изменений условий, способствующих развитию ПОЛ печени, но и затрагивали вопрос о возможном влиянии на процесс ПОЛ печени химических элементов, входящих в структуру пилокарпина и атропина, что и привело нас к проведению ряда экспериментов, посвящённых оценке способности липидов микросом печени подвергаться одноэлектронному окислению и восстановлению *in vitro* при раздельном присутствии пилокарпина и атропина в инкубационной среде.

Результаты экспериментов, проведенные *in vitro*, свидетельствовали, что присутствие отдельно пилокарпина и отдельно атропина в инкубационных средах и индуцировании ПОЛ микросом печени неферментативными механизмами усиливало окисление липидов микросом печени.

Так, пилокарпин инкубационной среды мольной концентрации  $10^{-4}$  М увеличивал окисление липидов микросом печени на 27,8% и атропин мольной концентрации  $10^{-5}$  М также усиливал окисление липидов микросом печени, оцененный нами в 3,6% (табл. 49).

**Табл. 49.** Влияние пилокарпина ( $10^{-4}$  М) и атропина ( $10^{-5}$  М) на неферментативное (аскорбатзависимое) окисление липидов микросом *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Пилокарпин $10^{-4}$ М	Атропин $10^{-5}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб $\Delta$ Емда микросом, n = 10	0,507 [0,386 ÷ 0,634]	0,464 [0,386 ÷ 0,634]
	2-ая групп проб $\Delta$ Емда микросом + метацин, n = 10	0,496 [0,358 ÷ 0,581] $P_{2-1} = 0,521$	0,556 [0,548 ÷ 0,597] $P_{2-1} = 0,393$
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб $\Delta$ Емда микросом, n = 10	9,906 [8,391 ÷ 11,04] $P_{3-1} = 0,0205$ $P_{3-2} = 0,00513$	9,976 [8,391 ÷ 11,04] $P_{3-1} = 0,00353$ $P_{3-2} = 0,00394$
	4-ая группа проб $\Delta$ Емда микросом + метацин, n = 10	12,189 [11,608 ÷ 12,944] $P_{4-1} = 0,00755$ $P_{4-2} = 0,00229$ $P_{4-3} = 0,00216$	10,244 [9,273 ÷ 11,408] $P_{4-1} = 0,00353$ $P_{4-2} = 0,0283$ $P_{4-3} = 0,336$
Окислительная активность фармакологических агентов		-27,8% [-12,5 ÷ -47,4]	-3,6% [+0,84 ÷ -12,3]

Индукция же ПОЛ микросом печени ферментативными механизмами приводило к противоположному эффекту – уменьшению окисления липидов микросом печени как в присутствии пилокарпина, так и атропина (табл. 50).

**Табл. 50.** Влияние пилокарпина ( $10^{-4}$  М) и атропина ( $10^{-5}$  М) на ферментативное (NADP•H-зависимое) окисление липидов микросом печени крыс *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Пилокарпин $10^{-4}$ М	Атропин $10^{-5}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб $\Delta$ Емда микросом, n = 10	0,298 [0,221 ÷ 0,487]	0,325 [0,221 ÷ 0,414]
	2-ая групп проб $\Delta$ Емда микросом + метацин, n = 10	0,296 [0,221 ÷ 0,331] $P_{2-1} = 0,699$	0,356 [0,331 ÷ 0,386] $P_{2-1} = 0,856$

Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ΔЕмда микросом, n=10	2, 698 [2,622 ÷ 2,811] P <sub>3-1</sub> = 0,0161 P <sub>3-2</sub> = 0,00675	2,622 [2,542 ÷ 2,76] P <sub>3-1</sub> = 0,0105 P <sub>3-2</sub> = 0,0122
	4-ая группа проб ΔЕмда микросом + метацин, n=10	2,494 [2,308 ÷ 2,611] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,00216	2,414 [2,401 ÷ 2,456] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,00216
Окислительная активность фармакологических агентов		+6,75% [+1,85 ÷ +15,7]	+10,45% [+8,36 ÷ +14,1]

Так как присутствие пилокарпина и атропина в тканевой среде печени предопределяет связывание их с mAChRs G-белков плазматических мембран клеток [2], то выясняя вопрос о возможной связи белковых образований мембран клеток с окислительной активностью пилокарпина и атропина, нами были проведены эксперименты по тепловой инактивации белковых структур в МЭРГ.

Были получены данные, свидетельствующие, что тепловая инактивация белковых структур МЭРГ [124] радикально не меняет направление ПОЛ, проведенное *in vitro* в присутствии пилокарпина и атропина. Тепловая инактивация белковых структур МЭРГ делает ПОЛ *in vitro* менее выраженным, но присутствие пилокарпина и атропина в инкубационной среде и индуцирование ПОЛ неферментативными механизмами сохраняет направленность окисления липидов МЭРГ – отмечается не выраженный окислительный эффект. При индуцировании же ПОЛ ферментативными механизмами становится более выраженной антиокислительная активность пилокарпина и атропина (табл. 51, 52).

**Табл. 51.** Влияние пилокарпина ( $10^{-4}$  М) и атропина ( $10^{-5}$  М) на ферментативное (NADP•H-зависимое) окисление липидов микросом печени крыс после тепловой обработки *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Пилокарпин $10^{-4}$ М	Атропин $10^{-5}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ΔЕмда микросом, n = 10	1,022 [1,015 ÷ 1,082]	1,005 [0,933 ÷ 1,027]
	2-ая групп проб ΔЕмда микросом + метацин, n = 10	1,004 [0,960 ÷ 1,051] P <sub>2-1</sub> = 0,588	1,062 [ 0,993 ÷ 1,136] P <sub>2-1</sub> = 0,856
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ΔЕмда микросом, n = 10	1,529 [1,490 ÷ 1,612] P <sub>3-1</sub> = 0,0205 P <sub>3-2</sub> = 0,00513	1,520 [1,486 ÷ 1,551] P <sub>3-1</sub> = 0,00467 P <sub>3-2</sub> = 0,0223

Окончание таблицы 51

	4-ая группа проб $\Delta E_{\text{МДА}}$ микросом + метацин, n=10	1,302 [1,269 ÷ 1,324] $P_{4-1} = 0,0205$ $P_{4-2} = 0,00513$ $P_{4-3} = 0,00394$	1,394 [1,352 ÷ 1,407] $P_{4-1} = 0,00467$ $P_{4-2} = 0,0223$ $P_{4-3} = 0,00394$
Окислительная активность фармакологических агентов		+39,6% [+34,5 ÷ +55,4]	+25,6% [+13,9 ÷ +57,6]

**Табл. 52.** Влияние пилокарпина ( $10^{-4}$  М) и атропина ( $10^{-5}$  М) на неферментативное (аскорбатзависимое) окисление липидов микросом печени крыс после тепловой обработки *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Пилокарпин $10^{-4}$ М	Атропин $10^{-5}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб $\Delta E_{\text{МДА}}$ микросом, n = 10	0,947 [0,937 ÷ 0,966]	0,948 [0,908 ÷ 0,966]
	2-ая групп проб $\Delta E_{\text{МДА}}$ микросом + метацин, n = 10	1,001 [0,968 ÷ 1, 108] $P_{2-1} = 0,00394$	0,988 [0,960 ÷ 1,022] $P_{2-1} = 0,0259$
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб $\Delta E_{\text{МДА}}$ микросом, n = 10	13,998 [13,911 ÷ 14,206] $P_{3-1} = 0,00267$ $P_{3-2} = 0,00394$	13,958 [13,386 ÷ 14,186] $P_{3-1} = 0,0007$ $P_{3-2} = 0,00394$
	4-ая группа проб $\Delta E_{\text{МДА}}$ микросом + метацин, n = 10	14,263 [13,496 ÷ 14,907] $P_{4-1} = 0,001$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,588$	14,068 [13,998 ÷ 14,332] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00394$ $P_{4-3} = 0,588$
Окислительная активность фармакологических агентов		- 2,1 % [ -4,6 ÷ +0,92 ]	- 0,875% [ -3,04 ÷ +3,3 ]

Таким образом, данные, полученные *in vitro*, свидетельствовали, что присутствие пилокарпина и атропина в инкубационной среде и индуцирование ПОЛ микросом печени неферментативными механизмами усиливало окисление липидов микросом печени. Индуцирование же ПОЛ микросом печени ферментативными механизмами при раздельном присутствии пилокарпина и атропина в инкубационной среде приводило к противоположному эффекту – уменьшению окисления липидов микросом печени. Тепловая инактивация белковых компонентов МЭРГ и индуцирование механизмов ПОЛ *in vitro* не вызывало изменений направления в окислении липидов микросом печени в присутствии пилокарпина и атропина, а только подчёркивало эту направленность.

#### **4.9. Заключение по результатам ПОЛ печени, полученным после введения животным пилокарпина и атропина при 5 днях голодовой нагрузки. Заключение по окислению липидов микросом печени в присутствии пилокарпина и атропина *in vitro***

Сопоставляя результаты проведенных экспериментов, отмечали, что данные, полученные *in vivo*, и результаты ПОЛ, полученные *in vitro* в присутствии пилокарпина и атропина, противоположны по направленности. Так, пилокарпин *in vivo* увеличивал содержание ДК ОЛ печени, ДК ОЛ микросом печени, ДК фракции СЖК печени, выраженность ГП фракции СЖК печени, ГП ОЛ микросом печени, содержание МДА ткани печени, МДА МЭРГ. Пилокарпин увеличивал при этом содержание и субстратных составляющих ПОЛ печени: МЭЖК Арахидной фракции СЖК, ТФК гомогената печени к 3-ей минуте эксперимента. Пилокарпин приводил к изменению и условий, способствующих развитию ПОЛ печени: увеличивал содержание *trans*-изомеров ЖК (на примере ЖК C<sub>18:2</sub> Δ9,12 линолевой, диеновой), содержание α-токоферола ОЛ печени. По направлению изменения содержания продуктов ПОЛ печени совпадали с эффектами окисления липидов микросом печени *in vitro*: пилокарпин увеличивал окисление липидов микросом индуцированием неферментативных механизмов ПОЛ.

Введение же животным атропина при 5-дневной голодовой нагрузке вызывало противоположный эффект – снижало содержание ДК ОЛ печени до уровня животных группы контроль-2, ДК ОЛ микросом печени, ДК фракции СЖК печени, уменьшало выраженность ГП фракции СЖК печени, ГП ОЛ микросом печени, снижало содержание МДА ткани печени до уровня, определяемого у животных группы контроль-2 и снижало содержание МДА МЭРГ.

Введение животным атропина уменьшало выраженность и в субстратных составляющих ПОЛ печени: отмечали снижение содержания МЭЖК Арахидной фракции СЖК печени, уменьшалось содержание ТФК к 3-ей минуте эксперимента. Атропин влиял и на условия, способствующие изменению ПОЛ печени: уменьшалось содержание *trans*-изомеров ЖК (на примере ЖК C<sub>18:2</sub> Δ9,12 линолевой, диеновой), содержание α-токоферола ОЛ печени, но присутствие атропина в инкубационной среде и индуцировании неферментативных механизмов окисления липидов микросом печени *in vitro* вызывало усиление окисления липидов.

Продолжая сопоставление данных экспериментов, можно ещё раз подчеркнуть факт проявления реципрокности, полученный *in vivo*: в продуктах ПОЛ пилокарпин уменьшал содержание ГП ОЛ печени, а атропин увеличивал этот показатель; в условиях, способствующих развитию ПОЛ печени, пилокарпин уменьшал содержание адреналина, йодного числа ОЛ и фрак-

ции СЖК печени, а атропин вызывал противоположный эффект – увеличивал выраженность перечисленных показателей.

При индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* и раздельном присутствия пилокарпина и атропина в инкубационной среде происходило однонаправленное уменьшение окисления липидов микросом печени. В тоже время данные по пилокарпину, полученные *in vivo*, свидетельствовали об увеличении содержания выше упомянутых продуктов ПОЛ печени, выраженности субстратных составляющих ПОЛ печени, что не может свидетельствовать в пользу влияния на ПОЛ печени только химических элементов, входящих в структуры пилокарпина и атропина.

В контексте сопоставления данных окисления липидов этот факт уместно сопоставить с влиянием пилокарпина и атропина на выраженность одного их продуктов ПОЛ печени *in vivo* – ГП ОЛ печени. (Напоминаем, введение животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней охлаждения вызывало проявление реципрокности при оценке содержания ГП ОЛ).

#### 4.10. Резюме к главе 4

Изучению влияния стресс-факторов внешней среды на биологический объект придаётся большое значение [109]. Одним из таких стресс-факторов окружающей среды, действующим на организм человека, является длительное действие низких температур [1; 44; 52]. Отмечено, что при такой нагрузке отмечается рост содержания катехоламинов крови [117], увеличение содержания продуктов ПОЛ тканей [60], регистрируются изменения и в антиокислительной системе организма [61].

Введение животным непрямого М,Н-холиномиметика неостигмина на фоне предварительного введения Н-холиноблокатора (гексаметоний) и 3-часовой холодовой нагрузки вызывало увеличение содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени при снижении содержания МДА ткани печени.

Сопоставление результатов ПОЛ печени, полученных *in vivo* в присутствии неостигмина и гексаметония, с результатами окисления липидов микросом печени, полученных *in vitro*, также в присутствии неостигмина и гексаметония, не позволило объяснить изменения содержания продуктов ПОЛ печени способностью только химических элементов в структурах комбинационно применяемых фармакологических агентов неостигмина и гексаметония вызывать изменения содержания продуктов ПОЛ печени. Поэтому анализ и сопоставление фактов, полученных *in vivo* и *in vitro* в эксперименте, привело нас к предположению о возможном влиянии на изменение содержания продуктов ПОЛ печени возбуждения mAChRs гепатоцитов эндогенным АХ. В связи с таким предположением и были продолжены эксперименты по оценке влияния холинотропных фармакологических агентов на изменения содержания продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ с оценкой изменений условий, способствующих развитию ПОЛ печени в период холодовых нагрузок.

Так, эксперименты, связанные с введением непрямого М,Н-холиномиметика неостигмина на фоне Н-холиноблокатора (гексаметоний) и отдельного введения М-холинолитика метацина при кратковременной холодовой нагрузки (3 ч) привели к обнаружению факта не только изменений в содержании продуктов ПОЛ, но и к обнаружению факта реципрокности: неостигмин на фоне предварительного введения Н-холинолитика (гексаметоний) увеличивал выраженность ДК ОЛ печени, а метацин (0,1 мг/кг; 1 мг/кг) уменьшал её; неостигмин на фоне гексаметония снижал выраженность ГП ОЛ печени, а метацин увеличивал её; неостигмин на фоне гексаметония увеличивал содержание МДА ткани печени, а метацин (0,1 мг/кг) снижал выраженность ТБК-активного продукта.

Подтверждая способность эндогенного АХ возбуждением, а введением М-холинолитика блокадой работы mAChRs плазматических мембран гепатоцитов и тем самым влиять на выраженность продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени, применили фармакологические агенты, действующие прямо, непосредственно на mAChRs плазматической мембраны гепатоцитов и получили результаты, свидетельствующие, что введение М-холиномиметика (пилокарпин) в период 5 дней холода увеличивало выраженность продуктов ПОЛ печени – ДК ОЛ печени, ДК фракции СЖК, ДК ОЛ МЭРГ; увеличивало ГП ОЛ, фракции СЖК, ГП ОЛ МЭРГ и увеличивало МДА ткани печени, МДА МЭРГ.

Пилокарпин при 5 днях охлаждения животных увеличивал содержание и субстратных составляющих ПОЛ – МЭЖК Арахис фракции СЖК печени; ТФК гомогената печени к 3-ей минуте экспериментов и активировал условия, способствующие развитию ПОЛ печени – увеличивал содержание trans-изомеров ЖК (на примере C<sub>18:2</sub> Δ9,12 линолевой, диеновой ЖК) фракции СЖК, содержание α-токоферола ОЛ печени.

Введение же животным атропина (М-холинолитик) в период 5 дней холодовой нагрузки вызывало противоположные по направлению эффекты непрямо (неостигмин) и прямо (пилокарпин) холиномиметикам – в продуктах ПОЛ печени атропин уменьшал ДК ОЛ печени до уровня группы животных, подвергавшихся только охлаждению, уменьшал ДК фракции СЖК, ДК ОЛ МЭРГ; уменьшал ГП ОЛ фракции СЖК, уменьшал ГП ОЛ МЭРГ и МДА ткани печени до уровня МДА животных группы контроль-2 (холод), уменьшал МДА МЭРГ.

Атропин в период 5 дней охлаждения животных уменьшал выраженность и в субстратных составляющих ПОЛ печени – в МЭЖК Арахис фракции СЖК печени; в ТФК гомогената печени к 3-ей минуте экспериментов и уменьшал выраженности условий, способствующих развитию ПОЛ печени – снижал содержание trans-изомеров ЖК (на примере C<sub>18:2</sub> Δ9,12 линолевой, диеновой ЖК) фракции СЖК, α-токоферола ОЛ печени.

На наш взгляд, следует подчеркнуть факт проявления реципрокности в не упомянутых, но перечисленных ранее показателях ПОЛ. Так, М-холино-

миметик (пилокарпин) на фоне 5 дней охлаждения животных среди продуктов ПОЛ снижал содержание ГП ОЛ печени; среди условий, способствующих развитию ПОЛ печени, – снижал содержание адреналина ткани печени, уменьшал йодное число ОЛ, фракции СЖК печени и снижал содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови, а М-холинолитик (атропин) действовал противоположно – повышал выраженность вышеперечисленных продуктов и составляющих субстратного обеспечения ПОЛ печени.

Сопоставляя данные, полученные *in vivo*, с данными *in vitro* (способность М-холиномиметика пилокарпина и М-холинолитика атропина окисляться с липидами МЭРГ) нами не была обнаружена способность пилокарпина и атропина влиять на содержание продуктов ПОЛ печени только химическими элементами, входящими в структуры фармакологических агентов, в том направлении, что были получены при окисления липидов печени *in vivo*. Поэтому, суммируя полученные данные, можно сделать общий вывод: возбуждение периферических mAChRs через эндогенный АХ, введение М-холиномиметика (пилокарпин), в большей части увеличивающего выраженность содержания продуктов ПОЛ, увеличивающего содержание субстратных составляющих ПОЛ печени и уменьшающего выраженность условий, способствующих развитию ПОЛ печени в период холодовых нагрузок, приводит к большому напряжению в работе клеточных мембран гепатоцитов, что, по всей видимости, послужит основой для дальнейшей работы по выяснению интимных механизмов в регуляции ПОЛ через холинорецепторный аппарат плазматической мембраны гепатоцитов.

Введение же периферического М-холиноблокатора в большинстве случаев уменьшало выраженность продуктов ПОЛ и выраженность в субстратных составляющих ПОЛ печени, но увеличивало выраженность в условиях, способствующих развитию ПОЛ печени периода холодовых нагрузок, а значит и вероятность срыва в работе плазматических мембран гепатоцитов. Таким образом, полученная информация послужит основой для дальнейшего выяснения возможной работы холинореактивных структур и в других паренхиматозных органах.

Установление закономерности влияния возбуждения периферических mAChRs через эндогенный АХ, через прямой М-холиномиметик, установление закономерности влияния блокады периферических mAChRs через М-холиноблокаторы и оценка содержания продуктов ПОЛ печени, субстратных составляющих ПОЛ печени и условий, способствующих развитию ПОЛ печени в период холодовых нагрузок, может послужить, возможно, предпосылкой для создания нового класса фармакологических соединений, влияющих на ПОЛ печени в период холодовых нагрузок через холинергическое звено. Ускорение или замедление процессов ПОЛ организма, потенцирование или предотвращение изменений в содержании продуктов ПОЛ имеет немаловажное значение и для предотвращения многих патологических процессов, преждевременного износа клеток, раннего старения биологической системы.

## Глава 5

# ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ РЕЦИПРОКНОСТИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ ОЦЕНКЕ ВЛИЯНИЯ КОМБИНАЦИЙ ХОЛИНОМИМТИКОВ И ХОЛИНОБЛОКАТОРОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОДУКТОВ И СУБСТРАТНЫХ СОСТАВЛЯЮЩИХ ПОЛ ПЕЧЕНИ КРЫС IN VIVO И IN VITRO ПОСЛЕ 3-ЧАСОВОЙ И 5-ДНЕВНОЙ ХОЛОДОВОЙ НАГРУЗКИ

Выяснение вопросов влияния накопленного эндогенного АХ ткани печени, АХ ткани печени *in situ*, введения неостигмина на фоне гексаметония, введения животным пилокарпина, метацина и атропина и оценки их влияния на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени требует выяснения аспектов, связанных с влиянием неостигмина, вводимого на фоне М-холинолитика, на выраженность продуктов ПОЛ, выраженность субстратных составляющих ПОЛ печени в период 3-часовой холодной нагрузки. (Напомним, что комбинационным введением фармакологических агентов – неостигмина и М-холинолитика достигалось возбуждение периферических nAChRs гепатоцитов эндогенным АХ).

Так как используемый метод экспериментальной фармакологии связан с применением непрямого М,Н-холиномиметика неостигмина на фоне предварительного введения М-холиноблокатора, то в данном разделе работы предложено описание результатов экспериментов с применением только периферического М-холинолитика метацина [72; 73].

Задачей данного раздела работы явилось выяснение вопросов, связанных с изменением содержания продуктов ПОЛ печени, возникающих после введения животным М-холинолитика метацина, дать оценку способности к окислению липидов микросом печени *in vitro* в присутствии метацина и сопоставить полученный материал.

## **5.1. Влияние метацина на содержание продуктов ПОЛ печени на фоне 3-часового охлаждения животных. Результаты ПОЛ, полученные *in vivo*, и сопоставление с ПОЛ микросом печени *in vitro* в присутствии метацина**

В предыдущих разделах работы было показано, что введение неостигмина в период 3 ч холодовой нагрузки и введение в ткань печени АХ *in situ* приводило к совпадению направленности при окислении липидов печени – увеличивалось содержание продуктов ПОЛ, содержание субстратных составляющих ПОЛ печени, отмечалось ускорение окислительной трансформации продуктов ПОЛ ткани печени. Сопоставление результатов экспериментов, полученных *in vivo* (в/бр введение животным неостигмина и введение АХ в ткань печени *in situ*) с результатами экспериментов, проводимых *in vitro*, привело к выводам, что изменения содержания продуктов ПОЛ печени не связаны с химическими элементами, входящими в структуры молекул неостигмина и АХ.

Исследования комбинационного введения животным неостигмина на фоне гексаметония показали совпадение результатов, возникающих при введении животным только неостигмина на фоне 3 ч холодовой нагрузки. А при отдельном введении М-холиноблокатора метацина отмечали проявление и феномена реципрокности. Введение животным прямого М-холиномиметика пилокарпина и М-холинолитика атропина в период 5 дней холода показывало проявление реципрокности при оценке содержания продуктов ПОЛ, проявление реципрокности и при оценке субстратных составляющих ПОЛ печени, проявление реципрокности в условиях, способствующих развитию ПОЛ печени.

Сопоставление результатов окисления липидов микросом печени, проведенных *in vitro*, с результатами окисления липидов печени *in vivo* в присутствии пилокарпина и атропина показало разнонаправленность эффектов получаемых при определении продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ. Полученные результаты послужили основанием для вывода, что химические элементы в структурах пилокарпина и атропина при данных условиях применения не способны влиять на изменения содержания продуктов ПОЛ печени, высказывалось мнение при этом о участии в этом процессе периферических mAChRs плазматической мембраны гепатоцитов.

Поэтому согласно поставленной ранее задаче, в данном разделе работы вводили животным только М-холинолитик метацин – эфир бензиловой кислоты и триметиламиноэтанола [79].

Животным опытных групп за 30 мин до охлаждения в/бр вводили метацин в дозах 0,01 мг/кг; 0,1 мг/кг и 1 мг/кг. Животным контрольных групп (контроль-1, контроль-2) за 30 мин до начала охлаждения в/бр вводили физиологический раствор в том же объёме, что и животным опытных групп.

В данном разделе работы демонстрировали изменения содержания только продуктов ПОЛ печени, полученных *in vivo*, – ДК ОЛ, ГП ОЛ печени и МДА ткани печени. Эти результаты сопоставляли со способностью липидов микросом печени окисляться индуцированием ПОЛ микросом печени *in vitro* ферментативными и неферментативными механизмами и с присутствием в инкубационной среде метацина. Результаты представлены в таблицах 51–83.

Были получены данные, свидетельствующие, что, как и в предыдущих разделах работы, 3-часовая холодовая нагрузка приводила к увеличению содержания ДК ОЛ печени (в 1,34 раза при сравнении с данными группы животных контроль-2), на фоне достоверного снижения ГП ОЛ печени и МДА ткани печени (табл. 53).

**Табл.53.** Влияние метацина на содержание диеновых конъюгатов, гидроперекисей общих липидов (нмоль/мг липида), малонового диальдегида гомогената печени (нмоль/мл гомогената) после 3-часового охлаждения крыс

Показатели	Диеновые конъюгаты	Гидроперекиси	Малоновый диальдегид
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	143,2 [155,8 ÷ 133,9]	11,95 [19,77 ÷ 9,463]	1,976 [2,108 ÷ 1,848]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	192,1 [203,3 ÷ 180,5] P <sub>2-1</sub> = 0,00216	8,326 [9,25 ÷ 7,04] P <sub>2-1</sub> = 0,00216	1,714 [1,8 ÷ 1,586] P <sub>2-1</sub> = 0,00216
3-ья группа, опыт-1 (холод + метацин 0,01 мг/кг), n=10	113,2 [121,2 ÷ 95,6] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,0003	5,0 [5,97 ÷ 3,87] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00107	1,878 [1,963 ÷ 1,843] P <sub>3-1</sub> = 0,703 P <sub>3-2</sub> = 0,00394
4-ая группа, опыт-2 (холод + метацин 0,1 мг/кг), n=10	126,4 [132,8 ÷ 113,2] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,0042 P <sub>4-3</sub> = 0,0411	5,786 [6,431 ÷ 5,107] P <sub>4-1</sub> = 0,00216 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,0546	1,808 [1,911 ÷ 1,704] P <sub>4-1</sub> = 0,0151 P <sub>4-2</sub> = 0,0411 P <sub>4-3</sub> = 0,0931
5-ая группа, опыт-3 (холод + метацин 1 мг/кг), n=10	137,6 [145,5 ÷ 114,5] P <sub>5-1</sub> = 0,179 P <sub>5-2</sub> = 0,00394 P <sub>5-3</sub> = 0,0373 P <sub>5-4</sub> = 0,309	14,266 [18,51 ÷ 11,794] P <sub>5-1</sub> = 0,262 P <sub>5-2</sub> = 0,00394 P <sub>5-3</sub> = 0,0003 P <sub>5-4</sub> = 0,00394	1,419 [1,634 ÷ 1,208] P <sub>5-1</sub> = 0,00216 P <sub>5-2</sub> = 0,0259 P <sub>5-3</sub> = 0,00216 P <sub>5-4</sub> = 0,00394

Введение животным метацина (0,01 мг/кг; 0,1 мг/кг) сопровождалось увеличением содержания МДА печени на 9,5% и 5,4% и снижением содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени, соответственно.

Метацин в дозе 1 мг/кг приводил к увеличению содержания только ГП ОЛ печени в 1,7 раза на фоне снижения ДК ОЛ и МДА гомогената пече-

ни, соответственно. Следовательно, холодовая нагрузка животных в период 3 ч приводила к увеличению ДК ОЛ печени на фоне сниженного содержания ГП ОЛ, МДА ткани печени. Метацин (0,01 мг/ кг; 0,1 мг/кг) у животных периода 3-часовой холодной нагрузки увеличивал содержание МДА ткани печени на фоне снижения ДК ОЛ и ГП ОЛ печени. Метацин в дозе 1 мг/кг приводил к росту ГП ОЛ печени при снижении ДК ОЛ и МДА ткани печени. Так как структура бензиловой кислоты соединена сложноэфирной связью с триметиламиноэтанолом и несёт ароматические кольца, связанные с гидроксилом кислотной части молекулы метацина [79], то подобные химические соединения способны оказывать изменение в окислении липидов печени [50]. Поэтому, как и в предыдущей главе, встал вопрос о направленности окисления липидов микросом печени при введении животным фармакологического агента метацина.

Сопоставление результатов экспериментов, индуцирующих ПОЛ микросом печени ферментативными механизмами *in vitro* в присутствии метацина мольной концентрации  $10^{-4}$  М;  $10^{-5}$  М и  $10^{-6}$  М, показало различные по направленности эффекты. Так, если индуцирование ПОЛ NADP•Н-зависимыми (ферментативными) механизмами вызывало ослабление окисления липидов микросом печени в инкубационной среде в присутствии метацина мольной концентрации  $10^{-4}$  М, то метацин мольной концентрации  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М приводил к противоположному эффекту – к увеличению окисления липидов микросом печени (табл. 54).

**Табл. 54.** Влияние метацина на ферментативное (NADP•Н-зависимое) ПОЛ микросом печени *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль /мг белка)

Показатели		Метацин $10^{-4}$ М	Метацин $10^{-5}$ М	Метацин $10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ΔЕмда микросом, n=10	0,169 [0,111 ÷ 0,248]	0,188 [0,128 ÷ 0,231]	0,279 [0,110 ÷ 0,496]
	2-ая групп проб ΔЕмда микросом + метацин, n=10	0,461 [0,260 ÷ 1,108] $P_{2-1} = 0,00494$	0,464 [ 0,34 ÷ 0,845] $P_{2-1} = 0,00395$	0,409 [0,221 ÷ 0,524] $P_{2-1} = 0,132$
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ΔЕмда микросом, n=10	2,273 [2,125 ÷ 2,506] $P_{3-1} = 0,0205$ $P_{3-2} = 0,004$	2,365 [2,245 ÷ 2,511] $P_{3-1} = 0,000297$ $P_{3-2} = 0,004$	2,363 [2,125 ÷ 2,506] $P_{3-1} = 0,00216$ $P_{3-2} = 0,00394$
	4-ая группа проб ΔЕмда микросом + метацин, n=10	2,37 [1,9767 ÷ 2,732] $P_{4-1} = 0,001$ $P_{4-2} = 0,00513$ $P_{4-3} = 0,521$	2,763 [2,516 ÷ 3,172] $P_{4-1} = 0,0001$ $P_{4-2} = 0,000297$ $P_{4-3} = 0,216$	2,666 [1,987 ÷ 2,842] $P_{4-1} = 0,00216$ $P_{4-2} = 0,00394$ $P_{4-3} = 0,0649^*$
Окислительная активность метацина		+13,8% [+7,5 ÷ +22,7]	-6,1% [+1,28 ÷ -12,2]	-8,3% [-30,4 ÷ +46,0]

Сопоставляя результаты экспериментов с метацином, полученные *in vivo* и *in vitro*, необходимо отметить следующее: введение метацина (0,01 мг/кг; 0,1 мг/кг) животным периода 3-часовой голодовой нагрузки увеличивало содержание МДА ткани печени на фоне снижения ДК ОЛ, ГП ОЛ печени. Метацин мольной концентрации  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М (напомним, данная мольная концентрация метацина в инкубационной среде соответствовала дозам метацина, вводимого животным – 0,01 мг/кг и 0,1 мг/кг) и индуцировании ПОЛ микросом печени *in vitro* ферментативными механизмами усиливал окисление липидов микросом печени (см. табл. 53, 54). Метацин же мольной концентрации  $10^{-4}$  М *in vitro* при индуцировании ПОЛ ферментативными механизмами вызывал выраженное уменьшение способности к окислению липидов микросом. Метацин в дозе 1 мг/кг *in vivo* (данная концентрация метацина *in vivo* соответствовала мольной концентрации метацина  $10^{-4}$  М, применяемого *in vitro*) на фоне 3-часовой голодовой нагрузки способствовал увеличению выраженности ГП ОЛ печени.

Сопоставление результатов окисления липидов печени, полученных *in vivo* и *in vitro* в присутствии метацина, требовало проведения дополнительных экспериментов, позволяющих внести ясность в трактовку получаемых результатов. Мы считаем, что таким приёмом является инактивация активности белкового компонента МЭРГ, вызываемая нагреванием микросом печени до  $+80^{\circ}\text{C}$ .

Так, проведенная тепловая инактивация белкового компонента МЭРГ и индуцирование ферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* показывало выраженное ослабление способности липидов микросом печени к окислению в присутствии метацина. Метацин мольной концентрации  $10^{-4}$  М инкубационной среды с микросомами печени, подвергавшихся тепловой обработке, выраженно уменьшал окисление липидов. Присутствие метацина мольной концентрации  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М с подвергавшимися тепловой инактивации микросомами печени сдвигало окисление липидов печени в противоположную сторону – вместо усиления окисления липидов микросом происходило ослабление. На наш взгляд, полученные результаты свидетельствуют о способности метацина влиять на ПОЛ печени в присутствии белка МЭРГ и свидетельствуют о связи белка МЭРГ с фармакологическим агентом метацином (табл. 55).

**Табл. 55.** Влияние метацина на ферментативное (NADP•Н-зависимое) ПОЛ микросом печени крыс после тепловой обработки (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Метацин $10^{-4}$ М	Метацин $10^{-5}$ М	Метацин $10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ΔЕмда микросом, n =10	0,804 [0,745 ÷ 0,883]	0,800 [0,745 ÷ 0,883]	0,799 [0,745 ÷ 0,883]

	2-ая групп проб ΔЕмда микросом + метацин, n=10	1,212 [1,159 ÷ 1,981] P <sub>2-1</sub> = 0,0161	0,912 [0,828 ÷ 1,104] P <sub>2-1</sub> = 0,0249	0,934 [0,907 ÷ 0,966] P <sub>2-1</sub> = 0,00216
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ΔЕмда микросом, n=10	1,223 [1,208 ÷ 1,242] P <sub>3-1</sub> = 0,00674 P <sub>3-2</sub> = 0,688	1,228 [1,208 ÷ 1,242] P <sub>3-1</sub> = 0,000131 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	1,215 [1,2 ÷ 1,242] P <sub>3-1</sub> = 0,0003 P <sub>3-2</sub> = 0,00394
	4-ая группа проб ΔЕмда микросом + метацин, n=10	1,162 [1,048 ÷ 1,214] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,109 P <sub>4-3</sub> = 0,0131	1,162 [1,148 ÷ 1,186] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,00216	1,072 [1,015 ÷ 1,132] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,00216
Окислительная активность метацина		+116,4% [+94,5 ÷ +122,5]	+ 40,8% [+29,9 ÷ +86,7]	+ 43,5% [+33,2 ÷ +88,9]

Результаты последующих серий экспериментов, проведенных по окислению липидов микросом печени в присутствии метацина, свидетельствовали о совпадении направления окисления липидов печени и индуцировании неферментативных механизмов ПОЛ *in vitro*. Так, метацин мольной концентрации  $10^{-5}$  М и  $10^{-6}$  М *in vitro* и индуцировании неферментативного механизма ПОЛ увеличивал окисление липидов микросом печени, а в мольной концентрации  $10^{-4}$  М присутствие метацина в инкубационной среде не выражено, но препятствовало окислению липидов (табл. 56).

**Табл. 56.** Влияние метацина на неферментативное (аскорбатзависимое) ПОЛ микросом печени крыс *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Метацин $10^{-4}$ М	Метацин $10^{-5}$ М	Метацин $10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ΔЕмда микросом, n=10	0,300 [0,262 ÷ 0,372]	0,307 [0,262 ÷ 0,372]	0,299 [0,262 ÷ 0,372]
	2-ая групп проб ΔЕмда микросом + метацин, n=10	0,489 [0,400 ÷ 0,565] P <sub>2-1</sub> = 0,00394	0,367 [0,221 ÷ 0,511] P <sub>2-1</sub> = 0,699	0,369 [0,289 ÷ 0,427] P <sub>2-1</sub> = 0,132
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ΔЕмда микросом, n=10	10,796 [10,143 ÷ 11,536] P <sub>3-1</sub> = 0,0003 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	11,004 [10,143 ÷ 11,536] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216	11,053 [10,143 ÷ 11,536] P <sub>3-1</sub> = 0,00216 P <sub>3-2</sub> = 0,00394

4-ая группа проб ΔЕмда микросом + метацин, n=10	10,954 [9,451 ÷ 12,903] P <sub>4-1</sub> = 0,00216 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,927	12,41 [12,378 ÷ 12,544] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,00216	11,264 [10,971 ÷ 11,508] P <sub>4-1</sub> = 0,00216 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,393
Окислительная активность метацина	+0,676% [-10,5% ÷ +8,4]	- 12,81% [-23,1 ÷ -7,78]	- 0,496% [-8,1% ÷ +1,74]

Подводя итог результатам ПОЛ печени как *in vivo*, так *in vitro* в присутствии метацина можно было отметить следующее: метацин инкубационной среды мольной концентрации  $10^{-5}$  М и  $10^{-6}$  М усиливал ПОЛ индуцированием ферментативных и неферментативных механизмов, а введение животному метацина (0,01 мг/кг и 0,1 мг/кг) также приводило к увеличению содержания одного из продуктов ПОЛ печени – МДА ткани печени на фоне уменьшения содержания ДК ОЛ, ГП ОЛ (по нашему предположению, подобное совпадение направленности окисления липидов свидетельствует об участии химических элементов метацина в индуцировании ПОЛ печени).

Но метацин в дозе 1 мг/кг увеличивал содержание только ГП ОЛ печени, а в концентрации  $10^{-4}$  М инкубационной среды (что соответствует дозе метацина 1 мг/кг) уменьшал окисление липидов микросом печени. Сопоставление фактов, полученных *in vivo* и *in vitro* при данных объёмных и мольных концентрациях с участием метацина, свидетельствует о разнонаправленности эффектов, вызываемых метацином как в дозе 1 мг/кг (*in vivo*), так и метацина мольной концентрации  $10^{-4}$  М *in vitro*. На наш взгляд, полученные факты не могут свидетельствовать в пользу влияния только химических элементов структуры метацина на ПОЛ печени.

Поэтому, предполагая участие в этом процессе холиноцептивного белка плазматической мембраны гепатоцитов, последующие эксперименты были посвящены выяснению вопроса о влиянии неостигмина, вводимого на фоне метацина и холодовой нагрузки, на изменение содержания продуктов ПОЛ печени.

## **5.2. Влияние неостигмина, вводимого на фоне метацина, на содержание продуктов ПОЛ печени после 3 ч охлаждения крыс. Результаты ПОЛ, полученные *in vivo*, и результаты окисления липидов микросом печени в присутствии неостигмина и метацина в инкубационной среде**

Сравнение результатов ПОЛ печени, полученных *in vivo* и *in vitro* в присутствии метацина, не позволяют сделать заключение о влиянии на ПОЛ печени только химических элементов структуры метацина, поэтому применяя, как и в предыдущей главе, метод возбуждения AChRs холинотропных

белков плазматической мембраны гепатоцитов эндогенным АХ с целью возбуждения периферических nAChRs плазматических мембран гепатоцитов, перед применением неостигмина животным предварительно вводили М-холинолитик метацин [72; 73]. Метацин (0,01 мг/кг; 0,1 мг/кг и 1 мг/кг) вводили в/бр за 30 мин до охлаждения животных и введения неостигмина. Животным контрольных групп (контроль-1, контроль-2) также за 30 мин до начала охлаждения в/бр вводили физиологический раствор в том же объеме, что и животным опытных групп.

Были получены следующие результаты. Так, если 3-часовая холодовая нагрузка приводила к росту содержания ДК ОЛ печени при сравнении с данными животных группы контроль-1 (интактные) в 1,35 раза, и этот факт отмечали на фоне снижения содержания ГП ОЛ печени, МДА ткани печени, то введение неостигмина на фоне метацина (1 мг/кг) приводило к увеличению содержания ДК ОЛ печени на 13,1% и ГП ОЛ на 200,9% при сравнении с данными группы контроль-2, соответственно. Неостигмин, вводимый на фоне метацина (0,1 мг/кг и 0,01 мг/кг) увеличивал ГП ОЛ печени на 72,5% и 335,6%, содержание МДА в группах животных опыт-2, опыт-3 на 1,9% и 15,2%, соответственно. Увеличение содержания ГП ОЛ, МДА групп животных опыт-2 и опыт-3 отмечали на фоне снижения ДК ОЛ печени, как в группе животных опыт-2, так и ДК ОЛ в группе животных опыт-3 (табл. 57).

**Табл. 57.** Влияние неостигмина на содержание диеновых конъюгатов, гидроперекисей общих липидов печени (нмоль/мг липида), малонового диальдегида ткани печени (нмоль/мл гомогената) после 3-часовой холодовой нагрузки у крыс

Показатели	Диеновые конъюгаты	Гидроперекиси	Малоновый диальдегид
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	138,9 [128,7 ÷ 142,6]	4,159 [3,577 ÷ 4,875]	1,735 [1,49 ÷ 1,959]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	187,8 [166,0 ÷ 193,1] P <sub>2-1</sub> = 0,00216	3,762 [3,281 ÷ 3,981] P <sub>2</sub> = 0,0259	1,276 [1,214 ÷ 1,407] P <sub>2-1</sub> = 0,00216
3-ья группа, опыт-1(холод + метацин 1 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10	212,4 [200,8 ÷ 233,3] P <sub>3-1</sub> = 0,00216 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	11,322 [7,448 ÷ 15,824] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,001	1,289 [1,628 ÷ 0,85] P <sub>3-1</sub> = 0,927 P <sub>3-2</sub> = 0,815
4-ая группа, опыт-2 (холод + метацин 0,1 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10	143,1 [128,2 ÷ 159,5] P <sub>4-1</sub> = 0,240 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,0003	6,491 [5,641 ÷ 7,012] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,000708 P <sub>4-3</sub> = 0,00216	1,301 [1,208 ÷ 1,417] P <sub>4-1</sub> = 0,00216 P <sub>4-2</sub> = 0,937 P <sub>4-3</sub> = 0,699
5-ая группа, опыт-3 (холод + метацин 0,01 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10	188,3 [148,8 ÷ 211,5] P <sub>5-1</sub> = 0,00216 P <sub>5-2</sub> = 0,937 P <sub>5-3</sub> = 0,0151 P <sub>5-4</sub> = 0,00865	16,389 [14,035 ÷ 17,641] P <sub>5-1</sub> = 0,00394 P <sub>5-2</sub> = 0,00216 P <sub>5-3</sub> = 0,00432 P <sub>5-4</sub> = 0,00394	1,471 [1,409 ÷ 1,691] P <sub>5-1</sub> = 0,0411 P <sub>5-2</sub> = 0,00216 P <sub>5-3</sub> = 0,0649 P <sub>5-4</sub> = 0,00432

Таким образом, если 3-часовая холодовая нагрузка увеличивала содержание ДК ОЛ печени на фоне снижения содержания ГП ОЛ и МДА ткани печени, то неостигмин на фоне метацина (1 мг/кг) приводил к росту содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени при недостоверном увеличении МДА. Введение неостигмина на фоне метацина (0,01 мг/кг и 0,1 мг/кг) сопровождалось увеличением содержания ГП ОЛ, МДА ткани печени при сниженном или определяемом на уровне животных контроль-2 содержании ДК ОЛ печени.

Оценив результаты экспериментов введения неостигмина на фоне метацина, мы по-прежнему задавали вопрос: «Не определяются ли изменения в содержании ДК ОЛ, ГП ОЛ и МДА ткани печени способностью химических элементов структур, входящих в комбинацию фармакологических агентов неостигмина и метацина под влиянием редокс-цепей ткани печени индуцировать переменную валентность и тем самым способствовать увеличению содержания продуктов ПОЛ печени?»

Были проведены эксперименты по окислению липидов микросом печени *in vitro* в присутствии комбинации фармакологических агентов – неостигмина и метацина в инкубационной среде.

(Напомним, в ранее проведенных экспериментах *in vitro* индуцирование ПОЛ ферментативными механизмами в присутствии только метацина мольной концентрации  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М усиливало окисление липидов микросом печени на 6,1% и 8,3%, соответственно, см. табл. 54). Комбинация фармакологических агентов с присутствием неостигмина  $10^{-4}$  М и метацина  $10^{-5}$  М и  $10^{-6}$  М в инкубационной среде также не меняла направления окисления липидов микросом печени – отмечали увеличение окисления липидов микросом печени лишь на 5,39% и 9,6 %, соответственно. Если метацин мольной концентрации  $10^{-4}$  М в инкубационной среде и индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ уменьшал окисление липидов микросом на 13,8% (см. табл. 54), то комбинация фармакологических агентов неостигмина  $10^{-4}$  М и метацина  $10^{-4}$  М и индуцирование ферментативного ПОЛ также приводила к уменьшению окисления липидов микросом печени на 9,025%, соответственно (табл. 58). Изменение же окисления липидов микросом печени и при комбинационном присутствии неостигмина и метацина инкубационной среды отмечали только при индуцировании неферментативного механизма ПОЛ. Метацин мольной концентрации  $10^{-6}$  М и активации неферментативного ПОЛ усиливал окисление липидов на 0,496% (см. табл. 56), а нахождение его *in vitro* в концентрации  $10^{-6}$  М и комбинации с неостигмином мольной концентрации  $10^{-4}$  М ослабляло окисление липидов микросом печени на 1,47%.

Отдельное нахождение метацина в инкубационной среде мольных концентраций  $10^{-4}$  М и  $10^{-5}$  М и присутствие метацина  $10^{-4}$  М и  $10^{-5}$  М в комбинации с неостигмином мольной концентрации  $10^{-4}$  М не меняло направление окисления липидов микросом, а меняло только выраженность окисления липидов при индуцировании неферментативного механизма ПОЛ (табл. 59).

**Табл. 58.** Влияние неостигмина и метацина на ферментативное (NADP•H-зависимое) ПОЛ микросом печени крыс *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Неостигмин 10 <sup>-4</sup> М + метацин 10 <sup>-4</sup> М	Неостигмин 10 <sup>-4</sup> М + метацин 10 <sup>-5</sup> М	Неостигмин 10 <sup>-4</sup> М + метацин 10 <sup>-6</sup> М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ΔЕмда микросом, n=10	0,296 [0,238 ÷ 0,448]	0,335 [0,281 ÷ 0,401]	0,332 [0,317 ÷ 0,408]
	2-ая групп проб ΔЕмда микросом, неостигмин + метацин, n=10	0,200 [0,121 ÷ 0,235] P <sub>2-1</sub> = 0,00216	0,391 [0,328 ÷ 0,432] P <sub>2-1</sub> = 0,002	0,392 [0,361 ÷ 0,471] P <sub>2-1</sub> = 0,0411
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ΔЕмда микросом, n=10	2,276 [2,018 ÷ 2,627] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216	2,378 [2,202 ÷ 2,811] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216	2,512 [2,108 ÷ 2,739] P <sub>3-1</sub> = 0,000874 P <sub>3-2</sub> = 0,00394
	4-ая группа проб ΔЕмда микросом, неостигмин + метацин, n=10	2,016 [1,801 ÷ 2,108] P <sub>4-1</sub> = 0,00216 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,0151	2,562 [2,415 ÷ 2,917] P <sub>4-1</sub> = 0,00216 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,132	2,758 [2,225 ÷ 2,961] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,179
Окислительная активность комбинации неостигмина и метацина		+ 9,025% [+4,5 ÷ +17,1]	- 5,39% [-13,5 ÷ +2,9]	- 9,6 % [-43,7 ÷ -3,17]

**Табл. 59.** Влияние неостигмина и метацина на неферментативное (аскорбатзависимое) ПОЛ микросом печени крыс *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Неостигмин 10 <sup>-4</sup> М + метацин 10 <sup>-4</sup> М	Неостигмин 10 <sup>-4</sup> М + метацин 10 <sup>-5</sup> М	Неостигмин 10 <sup>-4</sup> М + метацин 10 <sup>-6</sup> М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ΔЕмда микросом, n=10	0,293 [0,256 ÷ 0,324]	0,295 [0,271 ÷ 0,362]	0,289 [0,253 ÷ 0,370]
	2-ая групп проб ΔЕмда микросом, неостигмин + метацин, n=10	0,247 [0,202 ÷ 0,292] P <sub>2-1</sub> = 0,132	0,308 [0,298 ÷ 0,391] P <sub>2-1</sub> = 0,309	0,298 [0,262 ÷ 0,381] P <sub>2-1</sub> = 0,484
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ΔЕмда микросом, n=10	11,76 [10,506 ÷ 12,102] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216	11,663 [10,565 ÷ 12,314] P <sub>3-1</sub> = 0,00216 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	11,358 [10,243 ÷ 12,108] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216
	4-ая группа проб ΔЕмда микросом, неостигмин + метацин, n=10	11,21 [10,111 ÷ 11,608] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,109	11,812 [10,711 ÷ 12,472] P <sub>4-1</sub> = 0,00216 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,521	19,05 [19,11 ÷ 18,91] P <sub>4-1</sub> = 0,00216 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,588
Окислительная активность комбинации неостигмина и метацина		+3,84% [+3,04 ÷ +5,52]	- 1,175% [-1,3 ÷ -1,1]	+1,47% [+0,955 ÷ +2,98]

Таким образом, существенных различий в направленности окисления липидов микросом печени в присутствии только метацина и окислении липидов микросом с комбинацией фармакологических агентов неостигмина и метацина нами не выявлено. Изменения происходили при окислении липидов микросом печени и одновременном присутствии неостигмина мольной концентрации  $10^{-4}$  М, метацина мольной концентрации  $10^{-6}$  М инкубационной среды и индуцирования ПОЛ микросом печени неферментативными механизмами.

Мы считаем, что подобная разнонаправленность результатов экспериментов, полученных *in vivo* при введении неостигмина на фоне метацина, и результатов окисления липидов микросом печени, проведенных *in vitro* в присутствии неостигмина и метацина, невозможно объяснить только свойствами химических элементов, входящих в структуры фармакологических агентов неостигмина и метацина. Поэтому в качестве рабочей гипотезы высказываем предположение о возможном влиянии неостигмина на фоне метацина на изменение содержания продуктов ПОЛ печени эндогенным АХ через периферические nAChRs плазматической мембраны гепатоцитов.

Для получения ответа на это предположение мы использовали приём экспериментальной фармакологии – реципрокность и попытались дать ответ на эти вопросы через применение Н-холиноблокатора гексаметония.

### **5.3. Результаты окисления липидов микросом печени, проведенные *in vitro* в присутствии гексаметония. Сопоставление данных, полученных *in vitro*, с данными о влиянии гексаметония на содержание продуктов ПОЛ печени после 3-часового охлаждения крыс**

Методы, используемые экспериментальной фармакологией и примененные нами в опытах, предусматривали использование непрямого М,Н-холиномиметика неостигмина [72; 73] с целью одновременного возбуждения mAChRs метабототропных G-белков [154; 176; 228; 232; 243; 278; 282; 412; 491; 496] и nAChRs лиганд-проводящих ионных каналов [210; 307; 377; 468] плазматической мембраны гепатоцитов. Избирательное возбуждение мускариночувствительных или никотиночувствительных зон ацетилхолиновых белков плазматической мембраны клеток требует предварительного введения соответствующих М- или Н-холинолитиков [72], поэтому применение приёма экспериментальной фармакологии – реципрокности, на данном этапе исследования также потребовало введения отдельно от введения непрямого М,Н-холиномиметика неостигмина на фоне периферического М- или Н-холинолитика [72]. Для реше-

ния поставленной задачи (достижение реципрокности при возбуждении пAChRs эндогенным АХ) на данном этапе работы мы использовали отдельное введение комбинации непрямого М,Н-холиномиметика неостигмина с Н-холиноблокатором гексаметонием.

Так, как в решении поставленных ранее задач нами уже применялся Н-холиноблокатор гексаметоний и выяснялось изменение содержания продуктов ПОЛ печени – ДК ОЛ, ГП ОЛ печени, МДА ткани печени на фоне 3-часового охлаждения животных, и полученные результаты сопоставлялись со способностью липидов микросом печени окисляться *in vitro* при индуцировании ПОЛ микросом печени ферментативными и неферментативными механизмами, то воспользуемся выводами, сформулированными в разделе работы 4.1.

Выводы этого раздела свидетельствуют, что гексаметоний (0,2 мг/кг; 2 мг/кг; 20 мг/кг) при введении экспериментальным животным на фоне 3-часового охлаждения снижает содержание ДК ОЛ, ГП ОЛ печени, а в дозах 0,2 мг/кг и 2 мг/кг снижает содержание и МДА, определяемого в водной фазе гомогената печени. Окисление липидов микросом печени инкубационной среды в присутствии гексаметония мольных концентраций  $10^{-4}$  М;  $10^{-5}$  М;  $10^{-6}$  М и при индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ вызывало противоположный эффект – увеличение окисления липидов микросом печени. Результаты ПОЛ печени, полученные *in vivo* и *in vitro* в присутствии гексаметония противоположны по направленности, и поэтому на основании сопоставления результатов экспериментов был сделан вывод, что уменьшение содержания продуктов ПОЛ печени и введении гексаметония животным невозможно объяснить только свойствами химических элементов структуры гексаметония и что полученные выводы можно использовать как основу применения фармакологического агента гексаметония в методе экспериментальной фармакологии по типу реципрокности. Поэтому на следующем этапе работы нами был использован данный фармакологический агент.

#### **5.4. Содержание продуктов ПОЛ печени при введении животным неостигмина на фоне метацина и отдельного введения животным гексаметония при 3-часовом охлаждения животных (эффект реципрокности)**

В отличие от предыдущих исследований данная серия экспериментов (эксперименты с 3-часовой холодовой нагрузкой) приводила к увеличению содержания МДА гомогената печени в 1,54 раза, на фоне снижения ДК ОЛ, ГП ОЛ печени (табл. 60).

**Табл. 60.** Влияние неостигмина на фоне метацина, отдельно вводимого гексаметония на содержание диеновых конъюгатов и гидроперекисей общих липидов печени (нмоль/мг липида) после 3-часовой голодовой нагрузки

Показатели	Диеновые конъюгаты	Гидроперекиси
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	209,7 [195,6 ÷ 240,3]	9,811 [8,913 ÷ 11,01]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	182,15 [160,1 ÷ 194,1] P <sub>2-1</sub> = 0,00216	8,281 [8,105 ÷ 8,911] P <sub>2-1</sub> = 0,00216
3-ья группа, опыт-1(холод + метацин 1 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10	240,1 [228,9 ÷ 266,2] P <sub>3-1</sub> = 0,0163 P <sub>3-2</sub> = 0,000582	10,653 [9,911 ÷ 12,3] P <sub>3-1</sub> = 0,0591 P <sub>3-2</sub> = 0,00216
4-ая группа, опыт-2 (холод + метацин 0,1 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10	233,15 [222,7 ÷ 295,6] P <sub>4-1</sub> = 0,0411 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,393	10,061 [9,512 ÷ 11,673] P <sub>4-1</sub> = 0,484 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,240
5-ая группа, опыт-3 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n=10	154,25 [145,7 ÷ 162,8] P <sub>5-1</sub> = 0,00394 P <sub>5-2</sub> = 0,00865 P <sub>5-3</sub> = 0,00216 P <sub>5-4</sub> = 0,00394	7,966 [7,816 ÷ 8,1] P <sub>5-1</sub> = 0,00394 P <sub>5-2</sub> = 0,00216 P <sub>5-3</sub> = 0,00394 P <sub>5-4</sub> = 0,00216
6-ая группа, опыт-4 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10	174,9 [159,7 ÷ 184,3] P <sub>6-1</sub> = 0,00216 P <sub>6-2</sub> = 0,309 P <sub>6-3</sub> = 0,00216 P <sub>6-4</sub> = 0,00394 P <sub>6-5</sub> = 0,00865	8,013 [7,651 ÷ 8,103] P <sub>6-1</sub> = 0,00216 P <sub>6-2</sub> = 0,00394 P <sub>6-3</sub> = 0,00216 P <sub>6-4</sub> = 0,00216 P <sub>6-5</sub> = 0,484

Демонстрируя изменение результатов содержания ДК ОЛ печени, можно было отметить следующее: неостигмин на фоне предварительного введения животным метацина приводил к увеличению содержания ДК ОЛ печени в 1,31 раза в группе животных опыт-1 и увеличивал ДК ОЛ в 1,27 раза у животных группы опыт-2, соответственно. Введение животным отдельно гексаметония сопровождалось снижением на 15,4% содержания ДК ОЛ печени группы животных (опыт-3) и отмечали статистически недостоверное снижение ДК ОЛ у животных группы опыт-4, соответственно. Необходимо отметить, что с увеличением дозы метацина (1 мг/кг), вводимого перед неостигмином, отмечали снижение содержание ДК ОЛ печени при сравнении данных между группами животных опыт-1 и опыт-2. С увеличением дозы гексаметония (2 мг/кг) отмечали увеличение содержания ДК ОЛ печени в 1,13 раза группы животных опыт-4 и при сравнении с данными группы животных опыт-3.

Сопоставляя результаты по изменению содержания ДК ОЛ печени на фоне введения комбинации фармакологических агентов метацин + нео-

стигмин с отдельным введением гексаметония можно высказать следующее предположение. В случае комбинации фармакологических агентов неостигмин + метацин (1 мг/кг) изменение содержания ДК ОЛ, возможно, осуществляется через mAChRs гепатоцитов, а в случае применения гексаметония в предложенной дозе объясняется способностью химических элементов структуры гексаметония вызывать усиление окисления липидов печени.

Оценивая выраженность ГП ОЛ печени, нужно отметить, что введение неостигмина на фоне метацина (0,1 мг/кг; 1 мг/кг) приводило к увеличению содержания ГП ОЛ печени на 28,6% и 21,4% в группах животных опыт-1 и опыт-2, в то же время гексаметоний снижал ГП ОЛ печени лишь на 3,9% и 3,3%, соответственно. В экспериментах отмечали, что увеличение дозы отдельно вводимого гексаметония (2 мг/кг) приводило к росту ГП ОЛ при сравнении с данными групп животных опыт-3.

Таким образом, введение животным неостигмина на фоне метацина в период 3 ч холода увеличивало содержание ДК ОЛ печени, отдельное введение гексаметония (0,2 мг/кг) приводило к противоположному эффекту – снижению ДК ОЛ печени. Полученные данные свидетельствуют о проявлении факта реципрокности, полученной при оценке содержания ДК ОЛ печени и связанного с введением животным неостигмина на фоне метацина (0,1 мг/кг; 1 мг/кг) и отдельным введением гексаметония (0,2 мг/кг).

Сравнивая содержание ДК ОЛ печени между группами животных опыт-1 и опыт-2, отмечали, что введение неостигмина на фоне метацина (1 мг/кг) вызывало недостоверное снижение ДК ОЛ по отношению к группе животных опыт-1 (см. табл. 60).

Суммируя данные по содержанию ГП ОЛ печени, можно отметить, что введение животным неостигмина на фоне метацина (0,1 мг/кг; 1 мг/кг) с предложенным режимом холодовой нагрузки приводило к увеличению содержания ГП ОЛ печени. Введение же животным отдельно гексаметония (0,2 мг/кг; 2 мг/кг) приводило к противоположному эффекту – снижению ГП ОЛ печени. То есть, при оценке содержания ГП ОЛ печени, полученного при введении неостигмина на фоне метацина (0,1 мг/кг; 1 мг/кг) и отдельного введения гексаметония можно также отметить проявление реципрокности.

Сравнивая содержание ГП ОЛ между группами опыт-3 и опыт-4 отмечали, что гексаметоний в дозе 0,2 мг/кг вызывал снижение содержания ГП ОЛ печени, а гексаметоний в дозе 2 мг/кг вызывал увеличение выраженности ГП ОЛ.

Определяя МДА гомогената печени, необходимо было отметить, что в отличие от предыдущих экспериментов данная 3-часовая холодовая нагрузка приводила к увеличению содержания МДА ткани печени на фоне снижения ДК ОЛ и ГП ОЛ печени (табл. 61). Неостигмин с предварительно введённым метацином (0,1 мг/кг; 1 мг/кг) увеличивал содержание МДА на 9,8% и 13,7% в группах животных опыт-1 и опыт-2 при сравнении с данными групп животных контроль-2, соответственно.

**Табл. 61.** Влияние неостигмина, вводимого на фоне метацина и влияние отдельно вводимого гексаметония на содержание малонового диальдегида (нмоль/мл гомогената) после 3-часовой холодной нагрузки у крыс

Показатели	Малоновый диальдегид
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	1,238 [1,109 ÷ 1,305]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	1,911 [1,867 ÷ 2,09] P <sub>2-1</sub> = 0,00216
3-ья группа, опыт-1 (холод + метацин 1 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10	2,099 [2,048 ÷ 2,136] P <sub>3-1</sub> = 0,0649 P <sub>3-2</sub> = 0,000865
4-ая группа, опыт-2 (холод + метацин 0,1 мг/кг + неостигмин 0,2 мг/кг), n=10	2,173 [2,053 ÷ 2,241] P <sub>4-1</sub> = 0,00216 P <sub>4-2</sub> = 0,00459 P <sub>4-3</sub> = 0,0649
5-ая группа, опыт-3 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n=10	1,905 [1,881 ÷ 2,038] P <sub>5-1</sub> = 0,00216 P <sub>5-2</sub> = 0,937 P <sub>5-3</sub> = 0,00216 P <sub>5-4</sub> = 0,00394
6-ая группа, опыт-4 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10	2,293 [2,113 ÷ 2,319] P <sub>6-1</sub> = 0,00216 P <sub>6-2</sub> = 0,00394 P <sub>6-3</sub> = 0,00433 P <sub>6-4</sub> = 0,00216 P <sub>6-5</sub> = 0,0931

Отдельное введение животным гексаметония 0,2 мг/кг вызывало статистически недостоверное снижение МДА, а гексаметоний в дозе 2 мг/кг вызывал противоположный эффект – увеличивал содержание МДА в 1,19 раза при сравнении полученных данных с данными животных группы контроль-2, соответственно.

Таким образом, в данной серии экспериментов 3-часовая холодная нагрузка приводила к увеличению содержания МДА на фоне снижения ДК ОЛ, ГП ОЛ печени. Введение неостигмина на фоне метацина (0,1 мг/кг; 1 мг/кг) приводило к росту МДА. Отдельное введение гексаметония (0,2 мг/кг) вызывало статистически недостоверное снижение, а введение гексаметония дозы 2 мг/кг вызывало противоположный эффект – повышение содержания МДА ткани печени. На основании полученных данных сделать вывод о проявлении реципрокности при введении неостигмина на фоне метацина и отдельного введения гексаметония в определении содержания МДА ткани печени на фоне 3-часовой холодной нагрузки не представляется возможным.

### **5.5. Заключение по результатам введения отдельно метацина, введения неостигмина на фоне метацина и отдельного введения гексаметония в оценке содержания продуктов ПОЛ при 3-часовом охлаждении животных. Заключение по сопоставлению данных, полученных *in vivo* с данными *in vitro* в присутствии метацина, комбинационного присутствия неостигмина и метацина и отдельного присутствия гексаметония**

Определение продуктов ПОЛ печени периода 3-часовой голодовой нагрузки у животных методом введения непрямого М,Н-холиномиметика неостигмина на фоне метацина требует и сопоставления результатов ПОЛ, полученных *in vitro* в присутствии как метацина, так и применяемой комбинации фармакологических агентов метацин + неостигмин. Эксперименты показали, что метацин инкубационной среды мольной концентрации  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М увеличивал окисление липидов микросом печени при индуцировании ферментативных и неферментативных механизмов ПОЛ. И применение метацина (0,01 мг/кг и 0,1 мг/кг) *in vivo* также приводило к увеличению содержания МДА ткани печени на фоне снижения содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени.

Метацин *in vivo* в дозе 1 мг/кг вызывал увеличение ГП ОЛ на фоне снижения содержания ДК ОЛ печени и МДА ткани печени. Но мольная концентрация метацина  $10^{-4}$  М в инкубационной среде и индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ вызывала уменьшение окисления липидов микросом печени. (Данная мольная концентрация метацина инкубационной среды соответствует дозе метацина 1 мг/кг, вводимого животному)

Объяснить изменение содержания продуктов ПОЛ только способностью химических элементов структуры метацина запускать процесс ПОЛ печени при сопоставлении данных *in vivo* и *in vitro*, на наш взгляд, не представляется возможным. К тому же, факты изменения направления окисления липидов микросом печени, полученные *in vitro* в присутствии метацина после тепловой инактивации белков МЭРГ, подтверждает связь между окислительными эффектами метацина и белковыми структурами гепатоцитов. Сопоставление фактов, полученных *in vivo* и *in vitro* при применении метацина, предполагает в дальнейшем использовать его в методе возбуждения периферических nAChRs плазматической мембраны гепатоцитов эндогенным АХ.

Так, введение животным неостигмина на фоне метацина (0,01 мг/кг) приводило к росту содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени, но увеличение

содержания МДА ткани печени нами не отмечалось. Неостигмин на фоне метацина в дозах 0,1 мг/кг и 1 мг/кг приводил к увеличению выраженности ГП ОЛ и МДА ткани печени, но при снижении содержания ДК ОЛ печени.

Определяя окислительную активность комбинации фармакологических агентов неостигмина и метацина *in vitro*, было отмечено, что существенных различий между окислением липидов микросом печени в присутствии только метацина и в присутствии комбинации фармакологических агентов неостигмина и метацина не отмечено. Изменения окисления липидов возникают только в инкубационной среде и в присутствии неостигмина мольной концентрации  $10^{-4}$  М, метацина мольной концентрации  $10^{-6}$  М и индуцировании ПОЛ микросом печени неферментативными механизмами.

В применяемом методе реципрокности (применение неостигмина на фоне предварительного введения метацина с отдельным введением животным гексаметония) и в решении вопроса об окислительной активности Н-холинолитика гексаметония мы основывались на выводах раздела работы 4.1. Эти выводы свидетельствуют, что уменьшение содержания продуктов ПОЛ печени, полученных *in vivo* при введении гексаметония экспериментальным животным, объяснить только свойствами химических элементов структуры гексаметония считаем невозможным, и выводы по гексаметонию можно использовать как основу применяемого метода экспериментальной фармакологии – принципа реципрокности.

Возвращаясь к итогам проведенной работы, связанной с введением неостигмина на фоне метацина (0,1 мг/кг; 1 мг/кг) и отдельным введением гексаметония (0,2 мг/кг), можно отметить следующее. Результаты, полученные *in vivo*, свидетельствовали о проявлении реципрокности при определении содержания ДК ОЛ печени. При оценке содержания ГП ОЛ печени неостигмин на фоне метацина (0,1 мг/кг; 1 мг/кг) и отдельного введения гексаметония (0,2 мг/кг; 2 мг/кг) можно было также отметить присутствие феномена реципрокности. Введение же неостигмина на фоне метацина (0,1 мг/кг; 1 мг/кг) приводило к росту содержания МДА, но введение животным отдельно гексаметония в дозе 0,2 мг/кг вызывало недостоверное снижение, а введение дозы гексаметония 2 мг/кг вызывало противоположный эффект – повышение содержания МДА ткани печени. На основании сопоставления полученных фактов можно сделать заключение о возникновении реципрокности при введении неостигмина на фоне метацина и отдельно гексаметония при 3-часовом охлаждении животных, но не определении содержания МДА ткани печени.

## **5.6. Влияние никотина и гексаметония на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени, полученных *in vivo*, и влияние на изменение условий, способствующих росту ПОЛ печени при 5-дневном охлаждении животных. Результаты окисления липидов печени, полученных *in vivo*, и окисления липидов микросом печени *in vitro* в присутствии никотина и гексаметония**

В разделах работы, посвящённых влиянию возбуждения периферических nAChRs плазматической мембраны гепатоцитов эндогенным АХ, были описаны результаты, позволяющие сделать вывод, что свойства химических элементов, входящие в структуру метацина и применяемые дозы метацина мало влияют на изменение содержания продуктов ПОЛ печени, полученные *in vivo*. И этот вывод предполагает рекомендовать при проведении наших экспериментов перед применением непрямого М,Н-холиномиметика неостигмина введение метацина как периферического М-холиноблокатора.

Результаты экспериментов введения животным неостигмина на фоне метацина и 3-часового охлаждения сопровождались изменениями при оценке содержания ДК ОЛ, ГП ОЛ печени и МДА ткани печени. Сопоставление результатов, полученных *in vivo*, с результатами ПОЛ *in vitro*, полученных в присутствии комбинации неостигмина и метацина, привело к заключению об отсутствии влияния химических элементов, находящихся в структурах фармакологических агентов неостигмина и метацина на результаты одноэлектронного окисления и восстановления липидов печени *in vivo*. На основании этого высказывалось предположение о возможном участии в изменении содержания продуктов ПОЛ печени периферических nAChRs плазматических мембран гепатоцитов, и полученные выводы явились основанием для продолжения опытов с применением метода экспериментальной фармакологии – принципа реципрокности. Поэтому данный фармакологический агент (гексаметоний) и был рекомендован как периферический Н-холиноблокатор в методе реципрокности. Результатом применения неостигмина, вводимого на фоне метацина и введения отдельно гексаметония были получены данные, свидетельствующие о проявлении реципрокности при оценке содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени, но факт реципрокности при определении МДА ткани печени нами не была отмечен.

Для создания полного представления о способности nAChRs плазматической мембраны гепатоцитов влиять на субстратные составляющие ПОЛ, влиять на продукты ПОЛ периода холодных нагрузок, влиять на условия,

способствующие индуцированию ПОЛ печени, потребовалось введение фармакологических агентов, взаимодействующих непосредственно, прямо с nAChRs плазматической мембраны гепатоцитов и имеющих несколько отличную химическую структуру от комбинации ранее вводимых фармакологических агентов [72; 73]. Это достигалось введением никотина в дозах 0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг и 5 мг/кг. Эффект блокады периферических nAChRs вызывали введением гексаметония в дозах 0,2 мг/кг; 2 мг/кг и 20 мг/кг.

При введении животным никотина и гексаметония выясняли вопросы, связанные с оценкой содержания субстратных составляющих ПОЛ печени – МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахид, МЭЖК Эйкоза, и оценку изменения в содержании ТФК гомогената печени. С введением животным никотина и гексаметония связывали оценку и условий, способствующих изменению ПОЛ печени периода 5 дней холодовой нагрузки – 2,3-ДФГ эритроцитов крови; определение йодного числа ОЛ, фракции СЖК печени; адреналина и НА гомогената печени; способности гомогената печени продуцировать АФК и изменение содержания  $\alpha$ -токоферола в ОЛ печени. Полученные данные сопоставляли с изменением ДК ОЛ, ГП ОЛ печени, ДК и ГП фракции СЖК печени, МДА ткани печени.

Выяснение способности химических элементов структур никотина и гексаметония влиять на окисление липидов печени определяли индуцированием ПОЛ микросом печени *in vitro* ферментативными и неферментативными механизмами и сопоставляли с результатами экспериментов, полученными *in vivo*. Дозы никотина 0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг и 5 мг/кг и дозы гексаметония 0,2 мг/кг; 2 мг/кг и 20 мг/кг вводили животным за 30 мин до охлаждения. На данном этапе экспериментов охлаждение животных производили на протяжении 5 дней. Животным контрольных групп (контроль-1, контроль-2) за 30 мин до начала эксперимента в/бр вводили физиологический раствор в том же объеме, что и животным опытных групп.

Результаты экспериментов представлены таблицами 62–81.

Введение животным гексаметония приводило также к противоположным по направлению эффектам: если доза гексаметония 0,2 мг/кг снижала содержание адреналина в 1,95 раза, то дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг приводили к повышению адреналина ткани печени в 3,1 раза и 5,5 раза, соответственно (табл. 62).

**Табл. 62.** Влияния никотина и гексаметония на содержание адреналина и норадреналина гомогената печени (мкг/мл гомогената) после 5 дней охлаждения крыс

Показатели	Адреналин	Норадреналин
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	11,645 [10,869 ÷ 12,104]	31,785 [29,863 ÷ 34,123]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	2,536 [2,318 ÷ 2,809] P <sub>2-1</sub> = 0,0197	85,061 [82,367 ÷ 87,102] P <sub>2-1</sub> = 0,00394

3-ья группа, опыт-1 (холод + никотин 0,05 мг/кг), n=10	1,773 [1,305 ÷ 13,917] $P_{3-1} = 0,0003$ $P_{3-2} = 0,00394$	41,715 [38,215 ÷ 45,817] $P_{3-1} = 0,00216$ $P_{3-2} = 0,00394$
4-ая группа, опыт-2 (холод + никотин 0,5 мг/кг), n=10	6,594 [3,875 ÷ 7,761] $P_{4-1} = 0,00216$ $P_{4-2} = 0,00394$ $P_{4-3} = 0,00216$	98,421 [88,860 ÷ 115,16] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00216$
5-ая группа, опыт-3 (холод + никотин 5 мг/кг), n=10	12,103 [10,913 ÷ 13,487] $P_{5-1} = 0,262$ $P_{5-2} = 0,00394$ $P_{5-3} = 0,00216$ $P_{5-4} = 0,423$	57,869 [50,113 ÷ 63,146] $P_{5-1} = 0,00394$ $P_{5-2} = 0,00216$ $P_{5-3} = 0,00394$ $P_{5-4} = 0,00216$
6-ая группа, опыт-4 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n=10	1,298 [0,908 ÷ 1,596] $P_{6-1} = 0,00216$ $P_{6-2} = 0,00394$ $P_{6-3} = 0,0104$ $P_{6-4} = 0,00394$ $P_{6-5} = 0,00216$	202,17 [190,05 ÷ 211,63] $P_{6-1} = 0,00394$ $P_{6-2} = 0,00216$ $P_{6-3} = 0,00394$ $P_{6-4} = 0,0216$ $P_{6-5} = 0,00394$
7-ая группа, опыт-5 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10	7,771 [6,242 ÷ 8,852] $P_{7-1} = 0,00394$ $P_{7-2} = 0,00216$ $P_{7-3} = 0,0104$ $P_{7-4} = 0,00394$ $P_{7-5} = 0,00216$ $P_{7-6} = 0,00394$	25,962 [18,218 ÷ 30,256] $P_{7-1} = 0,0104$ $P_{7-2} = 0,00394$ $P_{7-3} = 0,00216$ $P_{7-4} = 0,00394$ $P_{7-5} = 0,00216$ $P_{7-6} = 0,00394$
8-ая группа, опыт-6 (холод + гексаметоний 20 мг/кг), n=10	14,039 [12,888 ÷ 14,915] $P_{8-1} = 0,00394$ $P_{8-2} = 0,00216$ $P_{8-3} = 0,0104$ $P_{8-4} = 0,00394$ $P_{8-5} = 0,00216$ $P_{8-6} = 0,00394$ $P_{8-7} = 0,00394$	95,48 [83,344 ÷ 109,15] $P_{8-1} = 0,00394$ $P_{8-2} = 0,0373$ $P_{8-3} = 0,00394$ $P_{8-4} = 0,521$ $P_{8-5} = 0,00394$ $P_{8-6} = 0,00216$ $P_{8-7} = 0,00394$

Присутствие классической реципрокности отмечено было при сопоставлении результатов групп животных опыт-2, опыт-3 и опыт-4. Так, если дозы никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг повышали содержание адреналина ткани печени в 2,6 раза и, в 4,7 раза, то гексаметоний в дозе 0,2 мг/кг снижал его в 1,95 раза, соответственно. Явление, трактуемое нами как реципрокность, было отмечено при сопоставлении результатов между группами животных опыт-1 и опыт-5; опыт-6 – доза никотина 0,05 мг/кг вызывала снижение содержания адреналина в 1,43 раза, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг повышали его выраженность в 3,1 и 5,5 раза, соответственно.

Таким образом, 5-дневная холодовая нагрузка, создаваемая животным, снижала выраженность адреналина ткани печени. Введение на данном фоне

охлаждения животных никотина и гексаметония разнонаправленно влияло на его содержание – доза никотина 0,05 мг/кг снижала, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг повышали; дозы никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг повышали, а доза гексаметония 0,2 мг/кг снижала содержание адреналина ткани печени.

Сопоставляя полученные данные с данными экспериментов по введению животным пилокарпина и атропина периода 5 дней охлаждения, можно отметить сходство в направленности получаемых результатов. Так, если доза никотина 0,05 мг/кг снижала содержание адреналина, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг повышали его выраженность, то введение пилокарпина (10 мг/кг) снижало содержание адреналина, а введение атропина (1 мг/кг) повышало его выраженность в ткани печени, но никотин в дозах 0,5 мг/кг и 5 мг/кг повышал, а гексаметоний в дозе 0,2 мг/кг снижал содержание адреналина ткани печени.

Следует обратить внимание на полученные ранее факты по неостигмину, вводимому на фоне 3-часовой холодовой нагрузки: содержание адреналина в гомогенате печени после 3-часового холода снижено, как и после 5 дней холода, но введение животным неостигмина на фоне 3-часовой холодовой нагрузки приводило к росту содержания адреналина ткани печени.

Оценивая содержание НА, определяемого в гомогенате печени и введении животным никотина и гексаметония, следует отметить, что 5-дневная холодовая нагрузка приводила к увеличению НА ткани печени. Как и в случае с адреналином, введение животным в данном режиме холодовой нагрузки никотина (0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг; 5 мг/кг) приводило к разнонаправленным результатам – дозы никотина 0,05 мг/кг; 5 мг/кг снижали, а доза никотина 0,5 мг/кг повышала выраженность НА при сравнении с данными группы животных контроль-2. Введение гексаметония также вызывало разнонаправленные эффекты – дозы гексаметония 0,2 мг/кг и 20 мг/кг увеличивали содержание НА ткани печени, а доза 2 мг/кг снижал его выраженность.

Сопоставляя результаты экспериментов между группами животных опыт-1 и опыт-6, необходимо было отметить следующее: если дозы никотина 0,05 мг/кг и 5 мг/кг снижали содержание НА в 2 раза и в 1,46 раза, то дозы гексаметония 0,2 мг/кг и 20 мг/кг увеличивали выраженность НА в 2,37 и в 1,12 раза; если доза никотина 0,5 мг/кг увеличивала выраженность НА в 1,15 раза, то гексаметоний 2 мг/кг снижал его содержание в 3,3 раза, соответственно.

Таким образом холодовая нагрузка, создаваемая животным в течение 5 дней, в отличие от данных по адреналину, приводила к увеличению НА ткани печени. Введение никотина и гексаметония на фоне данного режима охлаждения животных разнонаправленно влияло на выраженность НА – дозы никотина 0,05 мг/кг и 5 мг/кг снижали, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг и 20 мг/кг увеличивали эту выраженность; никотин 0,5 мг/кг увеличивал выраженность НА, а гексаметоний 2 мг/кг снижал её.

Сравнивая данные по изменению содержания НА с данными экспериментов введения животным пилокарпина и атропина при 5-дневном ох-

лаждении, можно отметить сходство только в одном – холодовая нагрузка в течение 5 дней увеличивала содержание НА ткани печени. Введение же животным пилокарпина и атропина на этом фоне охлаждения, в отличие от никотина и гексаметония, приводило к однонаправленному снижению содержания НА ткани печени. Следует напомнить, что введение неостигмина на фоне 3-часовой холодовой нагрузки приводило к снижению содержания НА ткани печени.

Таким образом, обобщая результаты экспериментов по содержанию катехоламинов ткани печени, необходимо обратить внимание на следующее. Холодовая нагрузка 5 дней снижала содержание адреналина ткани печени, и введение на фоне предложенного режима охлаждения животных никотина и гексаметония разнонаправленно влияло на содержание адреналина. Отмечали реципрокность – доза никотина 0,05 мг/кг снижала, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг повышали содержание адреналина; дозы никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг повышали выраженность адреналина ткани печени, а доза гексаметония 0,2 мг/кг снижала его.

Напоминаем, что введение животным пилокарпина (10 мг/кг) и атропина (1 мг/кг) на фоне 5 дней холодовой нагрузки также вызывало эффект реципрокности – пилокарпин снижал содержание адреналина, а атропин повышал его выраженность.

Следует обратить внимание, что и содержание адреналина гомогената печени периода 3-часовой холодовой нагрузки снижено, как и после 5 дней холода, но введение животным неостигмина периода 3 ч холода приводило к росту содержания адреналина ткани печени.

Холод 5 дней приводил к увеличению содержания НА ткани печени, и при этом также отмечали проявление реципрокности – доза никотина 0,5 мг/кг увеличивала выраженность НА, а гексаметоний 2 мг/кг снижал её. Помимо этого факта, отмечали и явление, сходное с реципрокностью – если дозы никотина 0,05 мг/кг и 5 мг/кг снижали содержание НА, то дозы гексаметония 0,2 мг/кг и 20 мг/кг увеличивали эту выраженность.

При сравнении данных содержания НА с данными экспериментов введения пилокарпина и атропина периода 5 дней охлаждения можно отметить сходство в следующем – холодовая нагрузка 5 дней увеличивала содержание НА ткани печени. Введение же животным пилокарпина и атропина на фоне данного режима охлаждения, в отличие от введения никотина и гексаметония, приводила к однонаправленному снижению содержания НА ткани печени.

Введение животным неостигмина периода 3 ч холода также приводило к снижению содержания НА ткани печени.

Как мы уже отмечали, одним из показателей способности липидов к индуцированию ПОЛ при стрессе, вызванном холодовой нагрузкой, служит изменение йодного числа [24; 445], определяемого нами в ОЛ и фракции СЖК печени и трактуемого нами как индикатор способности ненасыщенных компонентов липидов к изменению числа двойных связей в подготовке к ПОЛ.

## Не-нейрональный ацетилхолин печени

Были получены результаты свидетельствующие, что содержание молекулярного йода как ОЛ, так и фракции СЖК печени животных, подвергавшихся 5-дневной холодной нагрузке, уменьшено в 1,9 раза в ОЛ печени и в 1,36 раза во фракции СЖК печени, соответственно (табл. 63).

**Табл. 63.** Влияние никотина и гексаметония на содержание молекулярного йода (мкмоль /мг липида) общих липидов, фракции свободных жирных кислот печени после 5 дней холодной нагрузки у крыс

Показатели	Общие липиды печени	Фракция свободных жирных кислот печени
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	9,315 [8,52 ÷ 12,321]	59,811 [52,139 ÷ 64,112]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	4,706 [4,118 ÷ 5,197] P <sub>2-1</sub> = 0,00394	43,852 [40,274 ÷ 46,614] P <sub>2-1</sub> = 0,00394
3-ья группа, опыт-1 (холод + никотин 0,05 мг/кг), n=10	3,989 [3,872 ÷ 4,056] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216	8,695 [6,139 ÷ 10,113] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216
4-ая группа, опыт-2 (холод + никотин 0,5 мг/кг), n=10	3,301 [3,068 ÷ 3,714] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,00394	30,774 [28,703 ÷ 35,169] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,00394
5-ая группа, опыт-3 (холод + никотин 5 мг/кг), n=10	3,871 [2,909 ÷ 4,103] P <sub>5-1</sub> = 0,00394 P <sub>5-2</sub> = 0,00216 P <sub>5-3</sub> = 0,521 P <sub>5-4</sub> = 0,0781	66,027 [60,712 ÷ 75,818] P <sub>5-1</sub> = 0,0163 P <sub>5-2</sub> = 0,00394 P <sub>5-3</sub> = 0,00216 P <sub>5-4</sub> = 0,00394
6-ая группа, опыт-4 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n=10	5,903 [5,602 ÷ 6,105] P <sub>6-1</sub> = 0,00394 P <sub>6-2</sub> = 0,00216 P <sub>6-3</sub> = 0,00394 P <sub>6-4</sub> = 0,00216 P <sub>6-5</sub> = 0,00394	43,662 [40,117 ÷ 50,916] P <sub>6-1</sub> = 0,00394 P <sub>6-2</sub> = 0,872 P <sub>6-3</sub> = 0,00394 P <sub>6-4</sub> = 0,0216 P <sub>6-5</sub> = 0,00394
7-ая группа, опыт-5 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10	6,631 [5,725 ÷ 6,983] P <sub>7-1</sub> = 0,00394 P <sub>7-2</sub> = 0,00216 P <sub>7-3</sub> = 0,00394 P <sub>7-4</sub> = 0,00216 P <sub>7-5</sub> = 0,00394 P <sub>7-6</sub> = 0,0546	64,415 [58,638 ÷ 72,124] P <sub>7-1</sub> = 0,0781 P <sub>7-2</sub> = 0,00394 P <sub>7-3</sub> = 0,00216 P <sub>7-4</sub> = 0,00394 P <sub>7-5</sub> = 0,748 P <sub>7-6</sub> = 0,00216
8-ая группа, опыт-6 (холод + гексаметоний 20 мг/кг), n=10	6,342 [5,814 ÷ 6,705] P <sub>8-1</sub> = 0,00394 P <sub>8-2</sub> = 0,00216 P <sub>8-3</sub> = 0,00394 P <sub>8-4</sub> = 0,00216 P <sub>8-5</sub> = 0,00394 P <sub>8-6</sub> = 0,0546 P <sub>8-7</sub> = 0,471	95,48 [83,344 ÷ 109,15] P <sub>8-1</sub> = 0,00394 P <sub>8-2</sub> = 0,00216 P <sub>8-3</sub> = 0,00394 P <sub>8-4</sub> = 0,00216 P <sub>8-5</sub> = 0,0163 P <sub>8-6</sub> = 0,00394 P <sub>8-7</sub> = 0,0104

Введение животным никотина (0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг; 5 мг/кг) уменьшало содержание молекулярного йода ОЛ печени, введение же гексаметония (0,2 мг/кг, 2 мг/кг, 20 мг/кг) приводило к противоположному результату – увеличению поступления молекулярного йода в ОЛ печени. Во фракции СЖК печени изменения содержания молекулярного йода выглядели несколько иначе. Так, если дозы никотина 0,05 мг/кг и 0,5 мг/кг снижали выраженность молекулярного йода на 80,2% и 29,8%, то никотин 5 мг/кг приводил к увеличению его поступления во фракцию СЖК печени в 1,5 раза, соответственно.

Введение животным гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг приводило к увеличению содержания молекулярного йода во фракции СЖК печени на 46,8% и 117,7 %, а доза гексаметония 0,2 мг/кг не меняла его выраженность и определялось на уровне группы животных контроль-2, соответственно.

Таким образом, введение животным никотина 0,05 мг/кг и 0,5 мг/кг в период 5 дней охлаждения приводило к уменьшению содержания молекулярного йода фракции СЖК печени. Введение же животным доз гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг приводило к противоположному эффекту – повышению выраженности йодного числа. Никотин 5 мг/кг, вводимый на протяжении 5 дней охлаждения животных, повышал, а доза гексаметония 0,2 мг/кг приводила к снижению содержания молекулярного йода во фракции СЖК печени до уровня животных группы контроль-2. Напоминаем, что при определении йодного числа ОЛ печени было отмечено, что дозы никотина 0,05 мг/кг, 0,5 мг/кг и 5 мг/кг периода 5 дней охлаждения животных уменьшали, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг, 2 мг/кг и 20 мг/кг увеличивали выраженность молекулярного йода.

Обобщая данные в оценке содержания молекулярного йода ОЛ и фракции СЖК печени можно было отметить проявление реципрокности, определяемой как в ОЛ, так и во фракции СЖК печени при введении животным никотина и гексаметония. Сопоставляя полученные данные с экспериментами по введению животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней холода можно отметить, что введение животным пилокарпина также уменьшало выраженность йодного числа, как в ОЛ, так и во фракции СЖК печени, а атропин вызывал противоположный эффект – повышал эту выраженность.

Необходимо напомнить, что и введение животным неостигмина периода 3 ч холодовой нагрузки сопровождалось снижением поступления молекулярного йода в ОЛ и фракцию СЖК печени. Изменение не только количества, но и положения двойных связей алифатических цепочек ЖК липидных субстратов печени нами трактуется, как подготовительный этап в создании условий возникновения и развития ПОЛ. Так, на примере ЖК  $\Delta^9,12$  C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой нами показана способность никотина и гексаметония влиять на положение двойных связей в алифатической цепочки ЖК, показана возможность количественного изменения содержания как *cis*-, так и *trans*-изомеров ЖК ОЛ; как *cis*-, так и *trans*-изомеров ЖК фракции СЖК печени (табл. 64).

**Табл. 64.** Влияние никотина и гексаметония на содержание cis- и trans-изомеров ЖК Δ<sub>9</sub>,12 C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой (мкг/мл гомогената) в общих липидах печени после 5 дней охлаждения крыс

Показатели	Cis-изомеры ЖК Δ <sub>9</sub> ,12 C <sub>18:2</sub> линолевая, диеновая	Trans-изомеры ЖК Δ <sub>9</sub> ,12 C <sub>18:2</sub> линолевая, диеновая
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n = 10	4877,6 [4213,4 ÷ 5221,6]	13,629 [12,182 ÷ 14,152]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n = 10	3657,1 [3227,9 ÷ 3917,1] P <sub>2-1</sub> = 0,00216	16,776 [15,102 ÷ 18,901] P <sub>2-1</sub> = 0,00216
3-ья группа, опыт-1 (холод + никотин 0,05 мг/кг), n = 10	1421,85 [10213,6 ÷ 12024,5] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,000297	22,499 [20,618 ÷ 24,316] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,000297
4-ая группа, опыт-2 (холод + никотин 0,5 мг/кг), n = 10	2784,3 [2586,7 ÷ 3017,8] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,00394	1,758 [0,927 ÷ 2,633] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,000297 P <sub>4-3</sub> = 0,00216
5-ая группа, опыт-3 (холод + никотин 5 мг/кг), n = 10	2486,2 [2289,7 ÷ 2608,3] P <sub>5-1</sub> = 0,00394 P <sub>5-2</sub> = 0,00216 P <sub>5-3</sub> = 0,000297 P <sub>5-4</sub> = 0,00648	4,514 [3,819 ÷ 5,216] P <sub>5-1</sub> = 0,00394 P <sub>5-2</sub> = 0,0197 P <sub>5-3</sub> = 0,000062 P <sub>5-4</sub> = 0,00216
6-ая группа, опыт-4 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n = 10	4336,7 [3986,7 ÷ 4518,3] P <sub>6-1</sub> = 0,0249 P <sub>6-2</sub> = 0,00349 P <sub>6-3</sub> = 0,00216 P <sub>6-4</sub> = 0,00349 P <sub>6-5</sub> = 0,00216	13,914 [12,124 ÷ 15,008] P <sub>6-1</sub> = 0,521 P <sub>6-2</sub> = 0,0205 P <sub>6-3</sub> = 0,00267 P <sub>6-4</sub> = 0,00394 P <sub>6-5</sub> = 0,00216
7-ая группа, опыт-5 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10	2008,3 [1617,3 ÷ 2215,6] P <sub>7-1</sub> = 0,00394 P <sub>7-2</sub> = 0,00394 P <sub>7-3</sub> = 0,00216 P <sub>7-4</sub> = 0,00394 P <sub>7-5</sub> = 0,00216 P <sub>7-6</sub> = 0,00394	1,011 [0,817 ÷ 1,413] P <sub>7-1</sub> = 0,00216 P <sub>7-2</sub> = 0,000297 P <sub>7-3</sub> = 0,0001 P <sub>7-4</sub> = 0,0546 P <sub>7-5</sub> = 0,00394 P <sub>7-6</sub> = 0,00216
8-ая группа, опыт-6 (холод + гексаметоний 20 мг/кг), n = 10	1786,6 [1628,4 ÷ 1853,4] P <sub>8-1</sub> = 0,00216 P <sub>8-2</sub> = 0,00394 P <sub>8-3</sub> = 0,00216 P <sub>8-4</sub> = 0,00394 P <sub>8-5</sub> = 0,00216 P <sub>8-6</sub> = 0,00394 P <sub>8-7</sub> = 0,201	1,486 [1,108 ÷ 1,725] P <sub>8-1</sub> = 0,00394 P <sub>8-2</sub> = 0,0197 P <sub>8-3</sub> = 0,0001 P <sub>8-4</sub> = 0,423* P <sub>8-5</sub> = 0,00394 P <sub>8-6</sub> = 0,000297 P <sub>8-7</sub> = 0,0249

Холодовая нагрузка 5 дней приводила к уменьшению содержания *cis*-изомеров ЖК в 1,3 раза в ОЛ печени, и эта же холодная нагрузка приводила к росту содержания *trans*-изомеров ЖК ОЛ печени в 1,23 раза, соответственно. Введение животным никотина вызывало разнонаправленные эффекты при определении содержания *cis*-изомеров ЖК – доза никотина 0,05 мг/кг увеличивала их содержание в 3,12 раза, а дозы никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг снижали содержание *cis*-изомеров ЖК на 23,3% и на 32,1% ОЛ печени, соответственно.

Гексаметоний (доза 0,2 мг/кг) приводил к увеличению выраженности *cis*-изомеров ЖК в 1,18 раза, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг снижали содержание *cis*-изомеров ЖК на 45,1% и 51,2% при сравнении с данными групп животных контроль-2, соответственно.

Сопоставляя данные групп животных опыт-1 с данными групп животных опыт-5 и опыт-6, отмечали проявление реципрокности – доза никотина 0,05 мг/кг увеличивала, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг снижали содержание *cis*-изомеров ЖК в ОЛ печени. Сопоставляя данные групп животных опыт-2, опыт-3 и данные группы животных опыт-4, можно было также отметить явление, подобное реципрокности: если дозы никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг снижали выраженность *cis*-изомеров ЖК, то доза гексаметония 0,2 мг/кг приводила к противоположному эффекту – повышению их содержания в ОЛ печени.

Оценивая выраженность *trans*-изомеров ОЛ печени можно было отметить следующее: введение животным никотина на фоне 5 дней холода вызывало изменения и в содержании *trans*-изомеров ЖК, подобное тому, что возникает и при определении *cis*-изомеров ЖК – доза никотина 0,05 мг/кг вызывала увеличение *trans*-изомеров ЖК в 1,34 раза и дозы никотина 0,5 мг/кг, 5 мг/кг снижали содержание *trans*-изомеров ЖК на 89,5% и 73,1%, соответственно. Введение же животным доз гексаметония 0,2 мг/кг; 2 мг/кг и 20 мг/кг вызывало только отчетливое снижение содержания *trans*-изомеров ОЛ печени. Факт реципрокности при оценке содержания *trans*-изомеров ЖК нами отмечен при сопоставлении данных групп животных опыт-1 и опыт-4, опыт-5, опыт-6 – доза никотина 0,05 мг/кг повышала на 34,1%, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг; 2 мг/кг и 20 мг/кг достоверно снижали содержание *trans*-изомеров ЖК в ОЛ печени.

Таким образом, подводя итог результатам экспериментов по введению животным никотина и гексаметония с оценкой содержания *cis*- и *trans*-изомеров ЖК (на примере ЖК  $\Delta^9,12$  C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой) ОЛ печени после 5 дней охлаждения животных, можно было отметить, что доза никотина 0,05 мг/кг увеличивала, а в дозах 0,5 мг/кг и 5 мг/кг никотин уменьшал выраженность *cis*-изомеров. Доза гексаметония 0,2 мг/кг увеличивала, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг вызывали снижение содержания *cis*-изомеров ЖК  $\Delta^9,12$  C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой. Проявление реципрокности отмечали и в *cis*-изомерах ЖК ОЛ печени при сопоставлении данных по введению животным никотина (0,05 мг/кг) и гексаметония в дозах 2 мг/кг и 20 мг/кг.

Проявления, подобные реципрокности, отмечали при сопоставлении данных по гексаметонию в дозе 0,2 мг/кг и доз никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг.

При оценке содержания trans-изомеров ЖК ОЛ печени и введении никотина определяли также разнонаправленные эффекты – доза никотина 0,05 мг/кг повышала, а дозы никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг снижали выраженность trans-изомеров ЖК. Введение же животным гексаметония (0,2 мг/кг; 2 мг/кг и 20 мг/кг) вызывало только снижение содержания trans-изомеров ЖК ОЛ печени.

Проявление реципрокности отмечали при оценке содержания trans-изомеров ЖК в ОЛ печени и при сопоставлении данных по никотину (0,05 мг/кг) и гексаметонию (0,2 мг/кг; 2 мг/кг и 20 мг/кг).

Отмечая влияние никотина и гексаметония на изменение содержания cis- и trans-изомеров ЖК фракции СЖК печени можно было отметить, что холодовая нагрузка 5 дней снижала содержание cis-изомеров, но приводила к росту trans-изомеров ЖК фракции СЖК. Введение животным никотина и гексаметония на фоне 5 дней холода приводила к однонаправленному увеличению содержания только cis-изомеров ЖК фракции СЖК. При определении trans-изомеров ЖК фракции СЖК печени никотин также вызывал разнонаправленные эффекты – дозы никотина 0,05 мг/кг и 5 мг/кг вызывали снижение содержания trans-изомеров ЖК, а доза 0,5 мг/кг противоположный эффект – повышала содержание trans-изомеров ЖК (табл. 65).

**Табл. 65.** Содержание cis- и trans-изомеров ЖК  $\Delta 9,12 C_{18:2}$  линолевой, диеновой фракции СЖК печени (мкг/мл гомогената) после 5 дней охлаждения крыс

Показатели	Cis-изомеры ЖК семейства $\omega$ -6 $\Delta 9,12 C_{18:2}$ линолевой, диеновой	Trans-изомеры ЖК семейства $\omega$ -6 $\Delta 9,12 C_{18:2}$ линолевой, диеновой
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	4864,9 [3917,6 ÷ 5816,7]	13,673 [10,211 ÷ 16,812]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	731,5 [624,9 ÷ 819,6] $P_{2-1} = 0,00216$	23,01 [20,245 ÷ 25,116] $P_{2-1} = 0,00216$
3-ья группа, опыт-1 (холод + никотин 0,05 мг/кг), n=10	3240,4 [2812,7 ÷ 4219,3] $P_{3-1} = 0,0104$ $P_{3-2} = 0,00394$	11,507 [9,827 ÷ 16,715] $P_{3-1} = 0,109$ $P_{3-2} = 0,00161$
4-ая группа, опыт-2 (холод + никотин 0,5 мг/кг), n=10	2703,8 [2419,6 ÷ 3117,2] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,0453$	521,9 [475,6 ÷ 681,2] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,0197$
5-ая группа, опыт-3 (холод + никотин 5 мг/кг), n=10	749,5 [617,9 ÷ 811,5] $P_{5-1} = 0,00394$ $P_{5-2} = 0,748$ $P_{5-3} = 0,00216$ $P_{5-4} = 0,00394$	18,097 [15,643 ÷ 21,102] $P_{5-1} = 0,00648$ $P_{5-2} = 0,0104$ $P_{5-3} = 0,00648$ $P_{5-4} = 0,00394$

6-ая группа, опыт-4 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n=10	1703,9 [1447,3 ÷ 1891,2] P <sub>6-1</sub> = 0,00394 P <sub>6-2</sub> = 0,00216 P <sub>6-3</sub> = 0,00394 P <sub>6-4</sub> = 0,00216 P <sub>6-5</sub> = 0,00394	186,3 [157,6 ÷ 211,2] P <sub>6-1</sub> = 0,00394 P <sub>6-2</sub> = 0,002176 P <sub>6-3</sub> = 0,000297 P <sub>6-4</sub> = 0,00394 P <sub>6-5</sub> = 0,00216
7-ая группа, опыт-5 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10	2264,2 [2082,6 ÷ 2416,7] P <sub>7-1</sub> = 0,00394 P <sub>7-2</sub> = 0,00216 P <sub>7-3</sub> = 0,00394 P <sub>7-4</sub> = 0,00216 P <sub>7-5</sub> = 0,00394 P <sub>7-6</sub> = 0,00394	1204,3 [1081,7 ÷ 1364,5] P <sub>7-1</sub> = 0,00394 P <sub>7-2</sub> = 0,00216 P <sub>7-3</sub> = 0,000297 P <sub>7-4</sub> = 0,00394 P <sub>7-5</sub> = 0,00216 P <sub>7-6</sub> = 0,00394
8-ая группа, опыт-6 (холод + гексаметоний 20 мг/кг), n=10	955,7 [813,2 ÷ 1112,6] P <sub>8-1</sub> = 0,00394 P <sub>8-2</sub> = 0,00648 P <sub>8-3</sub> = 0,00216 P <sub>8-4</sub> = 0,00394 P <sub>8-5</sub> = 0,00216 P <sub>8-6</sub> = 0,00394 P <sub>8-7</sub> = 0,00394	0,726 [0,518 ÷ 0,961] P <sub>8-1</sub> = 0,00394 P <sub>8-2</sub> = 0,000297 P <sub>8-3</sub> = 0,00394 P <sub>8-4</sub> = 0,000297 P <sub>8-5</sub> = 0,00216 P <sub>8-6</sub> = 0,00394 P <sub>8-7</sub> = 0,00216

Гексаметоний в дозах 0,2 мг/кг и 2 мг/кг повышал, а в дозе 20 мг/кг снижал выраженность *trans*-изомеров ЖК во фракции СЖК. Проявление реципрокности *trans*-изомеров ЖК фракции СЖК печени отмечали при сопоставлении данных групп животных опыт-2 и групп животных опыт-6, если введение животным никотина дозы 0,5 мг/кг повышало содержание *trans*-изомеров, то доза гексаметония 20 мг/кг снижала их выраженность. Явление, подобное реципрокности, отмечали при сопоставлении данных групп животных опыт-1 и данных групп животных опыт-4 и опыт-5 – введение доз гексаметония 0,2 мг/кг и 2 мг/кг приводило к увеличению выраженности *trans*-изомеров ЖК, а доза никотина 0,05 мг/кг вызывала противоположный эффект – снижение содержания *trans*-изомеров ЖК, соответственно.

Суммируя результаты содержания *cis*- и *trans*-изомеров ЖК фракции СЖК печени и введении животным никотина и гексаметония периода 5 дней холода, можно отметить следующее: холод вызывал увеличение содержания *trans*-изомеров ЖК и во фракции СЖК печени. Никотин и гексаметоний на фоне 5 дней холода однонаправленно увеличивали содержание *cis*-изомеров ЖК во фракции СЖК. Оценивая изменения содержания *trans*-изомеров ЖК фракции СЖК печени отмечали, что доза никотина 0,5 мг/кг вызывала увеличение, а доза гексаметония 20 мг/кг – снижение содержания *trans*-изомеров ЖК. Полученный нами факт трактуется, как проявление реципрокности. Можно отметить и явление, подобное реципрокности, –

доза никотина 0,05 мг/кг снижала, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг и 2 мг/кг повышали содержание trans-изомеров ЖК фракции СЖК печени.

Таким образом, обобщая данные по содержанию cis- и trans-изомеров ЖК ОЛ, фракции СЖК печени и введении животным никотина и гексаметония периода 5 дней холодной нагрузки, можно отметить, что холод приводил к уменьшению cis-изомеров, но увеличивал содержание trans-изомеров ЖК ОЛ и trans-изомеров ЖК фракции СЖК печени. Никотин и гексаметоний на фоне 5 дней холода также разнонаправленно влияли на содержание cis- и trans-изомеров ЖК ОЛ и trans-изомеров фракции СЖК печени. Доза никотина 0,05 мг/кг увеличивала, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг уменьшали содержание cis- и trans-изомеров ЖК ОЛ печени; никотин дозы 0,5 мг/кг увеличивал, а гексаметоний дозы 20 мг/кг уменьшал выраженность trans-изомеров ЖК фракции СЖК печени. Следовательно, проявление реципрокности можно отметить как в cis-, так и в trans-изомерах ЖК ОЛ и в trans-изомерах ЖК фракции СЖК печени при введении животным никотина и гексаметония. Сравнивая полученные результаты с данными введения животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней холодной нагрузки, можно отметить, что реципрокность при возбуждении и блокаде периферических mAChRs плазматических мембран гепатоцитов отмечается только при определении содержания trans-изомеров ЖК фракции СЖК печени.

На наш взгляд необходимо выделить общую тенденцию исследований, связанных с введением животным неостигмина, пилокарпина и никотина: неостигмин 3-часовой холодной нагрузки; пилокарпин и никотин 5 дней холода приводили к увеличению содержания trans-изомеров ЖК-неостигмин в ОЛ печени; пилокарпин во фракции СЖК печени и никотин в ОЛ и фракции СЖК печени.

Безусловно, одним из условий увеличения ПОЛ тканей является присутствие в липидах PUFAs, с числом двойных связей более 2–3 [133; 375; 406; 407]. Приоритетность изменения расположения двойных связей в алифатических цепочках ЖК отдаётся PUFAs с числом углеродных атомов  $C_{20}$ . Мы считаем, что из изучаемых нами PUFAs, это ЖК семейства  $\omega$ -9 – DGLA; ЖК семейства  $\omega$ -6 – Арахидон и ЖК семейства  $\omega$ -3 – Эйкоза [115; 133; 345]. Определяя количественные изменения содержания МЭЖК семейства  $C_{20}$  при введении животным никотина и гексаметония периода 5 дней холодной нагрузки нами были отмечены следующие факты. Холод приводил к уменьшению содержания МЭЖК DGLA ОЛ, МЭЖК Арахидон ОЛ, но при этом отмечалось увеличение содержания МЭЖК Эйкоза ОЛ печени в 2,6 раза, соответственно. Оценивая влияние никотина на содержание МЭЖК DGLA ОЛ печени было отмечено, что дозы никотина 0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг и 5 мг/кг разнонаправленно влияли на содержание МЭЖК DGLA. Доза никотина 0,05 мг/кг увеличивала, а дозы 0,5 мг/кг и 5 мг/кг уменьшали выраженность МЭЖК DGLA (табл. 66).

Табл. 66. Влияние никотина и гексаметония на содержание метиловых эфиров жирных кислот  $C_{20}$  (МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахис, МЭЖК Эйкоза) общих липидов печени (мкг/мл гомогената) после 5-дневного охлаждения крыс

Показатели	МЭЖК $\Delta 11,14,17$ $C_{20:3}$ эйкозагриеновой ЖК (digomo- $\gamma$ -linolenic acid), (МЭЖК DGLA)	МЭЖК $\Delta 5,8,11,14$ $C_{20:4}$ эйкозагетрае- новой ЖК (МЭЖК Арахис)	МЭЖК $\Delta 5,8,11,14,17$ $C_{20:5}$ эйкозапентаено- вой ЖК (МЭЖК Эйкоза)
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	6155,6 [5906,2÷6513,2]	5,022 [4,724÷5,627]	77,112 [69,56÷91,08]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	5376,2 [5001,9÷5806,2] $P_{2-1} = 0,00216$	4,189 [3,807÷4,629] $P_{2-1} = 0,00216$	117,81 [109,9÷132,1] $P_{2-1} = 0,00216$
3-ья группа, опыт-1 (холод + никотин 0,05 мг/кг), n=10	10923,3 [8143,1÷12732,2] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,000297$	18,263 [16,307÷20,156] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,000297$	314,89 [295,6÷350,1] $P_{3-1} = 0,000297$ $P_{3-2} = 0,00394$
4-ая группа, опыт-2 (холод + никотин 0,5 мг/кг), n=10	3742,5 [3112,2÷4213,2] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00394$	2,666 [2,115÷3,318] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00394$	18,855 [16,51÷26,39] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00394$
5-ая группа, опыт-3 (холод + никотин 5 мг/кг), n=10	3971,6 [3628,9÷4507,2] $P_{5-1} = 0,00394$ $P_{5-2} = 0,00216$ $P_{5-3} = 0,00394$ $P_{5-4} = 0,200$	0,886 [0,716÷1,213] $P_{5-1} = 0,00394$ $P_{5-2} = 0,00216$ $P_{5-3} = 0,000297$ $P_{5-4} = 0,00394$	21,59 [16,325÷26,411] $P_{5-1} = 0,00394$ $P_{5-2} = 0,000297$ $P_{5-3} = 0,00216$ $P_{5-4} = 0,631$
6-ая группа, опыт-4 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n=10	6168,2 [6913,5÷5562,7] $P_{6-1} = 0,931$ $P_{6-2} = 0,0104$ $P_{6-3} = 0,00394$ $P_{6-4} = 0,00216$ $P_{6-5} = 0,00394$	5,188 [4,428÷6,209] $P_{6-1} = 0,784$ $P_{6-2} = 0,0104$ $P_{6-3} = 0,00394$ $P_{6-4} = 0,00216$ $P_{6-5} = 0,00394$	128,5 [109,3÷142,8] $P_{6-1} = 0,00394$ $P_{6-2} = 0,336$ $P_{6-3} = 0,00216$ $P_{6-4} = 0,00394$ $P_{6-5} = 0,00216$
7-ая группа, опыт-5 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10	2097,1 [1876,3÷2961,2] $P_{7-1} = 0,00394$ $P_{7-2} = 0,00216$ $P_{7-3} = 0,00394$ $P_{7-4} = 0,00216$ $P_{7-5} = 0,00394$ $P_{7-6} = 0,00216$	1,396 [0,927÷1,689] $P_{7-1} = 0,00394$ $P_{7-2} = 0,00216$ $P_{7-3} = 0,00394$ $P_{7-4} = 0,00216$ $P_{7-5} = 0,0104$ $P_{7-6} = 0,00394$	51,724 [42,117÷86,216] $P_{7-1} = 0,00373$ $P_{7-2} = 0,00394$ $P_{7-3} = 0,00216$ $P_{7-4} = 0,00394$ $P_{7-5} = 0,00216$ $P_{7-6} = 0,00394$
8-ая группа, опыт-6 (холод + гексаметоний 20 мг/кг), n=10	2036,7 [1811,9÷2976,8] $P_{8-1} = 0,00394$ $P_{8-2} = 0,00216$ $P_{8-3} = 0,000297$ $P_{8-4} = 0,00394$ $P_{8-5} = 0,00216$ $P_{8-6} = 0,00394$ $P_{8-7} = 0,631$	0,270 [0,118÷0,463] $P_{8-1} = 0,00394$ $P_{8-2} = 0,00216$ $P_{8-3} = 0,000297$ $P_{8-4} = 0,00394$ $P_{8-5} = 0,00216$ $P_{8-6} = 0,00394$ $P_{8-7} = 0,00216$	45,573 [38,235÷56,117] $P_{8-1} = 0,00394$ $P_{8-2} = 0,00216$ $P_{8-3} = 0,00394$ $P_{8-4} = 0,00216$ $P_{8-5} = 0,00394$ $P_{8-6} = 0,00216$ $P_{8-7} = 0,109$

Введение животным гексаметония также вызывало разнонаправленные изменения содержания МЭЖК DGLA: доза гексаметония 0,2 мг/кг повышала содержание МЭЖК DGLA, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг уменьшали их выраженность и при этом отмечалось дозозависимое снижение МЭЖК DGLA в ОЛ. Реципрокность МЭЖК DGLA ОЛ печени отмечали при сопоставлении данных групп животных опыт-1 и опыт-5, опыт-6 – доза никотина 0,05 мг/кг увеличивала содержание МЭЖК DGLA, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг уменьшали МЭЖК DGLA. Изменения МЭЖК DGLA ОЛ печени и введении дозы гексаметония 0,2 мг/кг и доз никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг мы трактуем, как реципрокность. В оценке содержания МЭЖК Арахис ОЛ печени было отмечено, что дозы никотина 0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг и 5 мг/кг также разнонаправленно влияли на содержание МЭЖК Арахис – доза никотина 0,05 мг/кг повышала, а дозы 0,5 мг/кг и 5 мг/кг уменьшали выраженность МЭЖК Арахис. В группах животных опыт-2 и опыт-3 отмечалось дозозависимое снижение содержания МЭЖК Арахис. Определяя МЭЖК Арахис ОЛ печени гексаметоний вызывал также разнонаправленные эффекты – введение животным гексаметония дозы 0,2 мг/кг повышало содержание МЭЖК Арахис в 1,23 раза, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг снижали содержание МЭЖК Арахис, при этом отмечали дозозависимое снижение МЭЖК Арахис.

Сопоставляя данные групп животных опыт-1 и опыт-5, опыт-6 отмечали проявление реципрокности – доза никотина 0,05 мг/кг повышала, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг снижали выраженность МЭЖК Арахис ОЛ печени. Феномен, трактуемый как реципрокность, отмечали при сопоставлении результатов групп опыт-2, опыт-3 и опыт-4 – так, если введение животным дозы гексаметония 0,2 мг/кг повышало выраженность МЭЖК Арахис по отношению к группе животных контроль-2, то уровень МЭЖК и введении доз никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг оказывался ниже результатов группы животных контроль-2. Введение животным доз никотина 0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг и 5 мг/кг и определении МЭЖК Эйкоза ОЛ печени периода 5 дней холода также разнонаправленно влияло на содержание МЭЖК Эйкоза – доза никотина 0,05 мг/кг увеличивала, а дозы никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг уменьшали выраженность МЭЖК Эйкоза ОЛ печени.

Гексаметоний вызывал также разнонаправленные эффекты – введение животным дозы гексаметония 0,2 мг/кг вызывало увеличение содержания МЭЖК Эйкоза ОЛ на 9,1%, в дозах 2 мг/кг и 20 мг/кг гексаметоний вызывал снижение МЭЖК Эйкоза ОЛ в 2,2 и 2,5 раза, соответственно, при этом отмечали дозозависимое снижение МЭЖК Эйкоза. Реципрокность содержания МЭЖК Эйкоза ОЛ печени выявлена при сопоставлении результатов групп животных опыт-1 и опыт-5, опыт-6 – доза никотина 0,05 мг/кг повышала, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг снижали выраженность МЭЖК Эйкоза ОЛ. Эффект, трактуемый нами как реципрокность, отмечали при сопоставлении результатов групп животных опыт-2, опыт-3 и опыт-4 – доза гексаметония 0,2 мг/кг повышала содержание МЭЖК Эйкоза по отношению

групп животных контроль-2, а дозы никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг приводили к уменьшению содержания МЭЖК Эйкоза ОЛ при сравнении с данными животных группы контроль-2, соответственно.

Таким образом, определяя МЭ PUFAs семейства  $C_{20}$  ОЛ печени периода 5 дней холодовой нагрузки отмечали снижение содержания МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса, но повышение МЭЖК Эйкоза. Во всех МЭЖК семейства  $C_{20}$  – МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса и МЭЖК Эйкоза – дозы никотина 0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг и 5 мг/кг разнонаправленно действовали на содержание МЭЖК – доза никотина 0,05 мг/кг повышала содержание МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса, МЭЖК Эйкоза и дозы никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг снижали выраженность всех трёх представителей МЭЖК семейства  $C_{20}$ .

Гексаметоний 5 дней холода также разнонаправленно действовал на содержание МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса и МЭЖК Эйкоза ОЛ печени – доза гексаметония 0,2 мг/кг приводила к увеличению содержания МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса и МЭЖК Эйкоза, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг снижали их выраженность.

Феномен реципрокности отмечали при сопоставлении данных содержания МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса и МЭЖК Эйкоза ОЛ печени – никотин в дозе 0,05 мг/кг увеличивал выраженность всех трёх МЭЖК  $C_{20}$ , а гексаметоний в дозах 2 мг/кг и 20 мг/кг их снижал.

Изменение данных содержания МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса и МЭЖК Эйкоза ОЛ печени и трактуемых как реципрокность отмечали сопоставлением результатов введения животным дозы гексаметония 0,2 мг/кг и результатов введения доз никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг – гексаметоний увеличивал, а никотин снижал содержание МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса и МЭЖК Эйкоза ОЛ (см. табл. 66).

Определяя влияние никотина, гексаметония на содержание МЭ PUFAs семейства  $C_{20}$  ОЛ печени холодого периода невозможно было не затронуть и вопрос о результатах введения животным никотина и гексаметония во фракции СЖК печени. Результаты экспериментов свидетельствовали, что холод 5 дней приводил к уменьшению содержания МЭ PUFAs семейства  $C_{20}$  – МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса и МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени.

Введение животным никотина (0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг; 5 мг/кг) так же, как и в ОЛ печени, разнонаправленно действовало на содержание МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса и МЭЖК Эйкоза – доза никотина 0,05 мг/к увеличивала содержание всех трёх МЭЖК  $C_{20}$ , а дозы никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг снижали выраженность МЭЖК  $C_{20}$ , за исключением МЭЖК Эйкоза – доза никотина 0,5 мг/к увеличивала содержание МЭЖК Эйкоза в 2 раза во фракции СЖК.

Введение животным гексаметония также разнонаправленно действовало на содержание МЭЖК семейства  $C_{20}$  фракции СЖК печени – при определении МЭЖК DGLA введение животным дозы гексаметония 0,2 мг/кг увеличивало МЭЖК в 1,4 раза, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг вызывали дозозависимое снижение МЭЖК DGLA на 63,7 % и 96,9%, соответственно (табл. 67).

## Не-нейрональный ацетилхолин печени

**Табл. 67.** Влияние никотина и гексаметония на содержание метиловых эфиров жирных кислот C<sub>20</sub> (МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахис, МЭЖК Эйкоза) фракции СЖК печени (мкг/мл гомогената) после 5 дней охлаждения крыс

Показатели	МЭЖК Δ11, 14, 17 C <sub>20:3</sub> эйкозатриено- вой ЖК (digomo- γ-linolenic acid) (МЭЖК DGLA)	МЭЖК Δ5,8,11,14 C <sub>20:4</sub> эйкозатетраено- вой ЖК (МЭЖК Арахис)	МЭЖК Δ5,8,11,14,17 C <sub>20:5</sub> эйкозопентаено- вой ЖК (МЭЖК Эйкоза)
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	1958,7 [1872,4 ÷ 2110,2]	59,909 [48,209 ÷ 64,703]	60,615 [56,743 ÷ 66,708]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	444,4 [403,2 ÷ 512,2] P <sub>2-1</sub> =0,00216	31,688 [30,614 ÷ 36,117] P <sub>2-1</sub> =0,00216	31,511 [29,915 ÷ 32,868] P <sub>2-1</sub> =0,00216
3-ья группа, опыт-1 (холод + никотин 0,05 мг/кг), n=10	547,9 [499,1 ÷ 612,8] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,0103	40,054 [37,225 ÷ 42,813] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216	52,674 [48,708 ÷ 56,813] P <sub>3-1</sub> = 0,00433 P <sub>3-2</sub> = 0,00216
4-ая группа, опыт-2 (холод + никотин 0,5 мг/кг), n=10	278,8 [200,9 ÷ 350,9] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,00394	17,821 [16,114 ÷ 22,123] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,00394	65,214 [58,415 ÷ 78,618] P <sub>4-1</sub> = 0,179 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,00394
5-ая группа, опыт-3 (холод + никотин 5 мг/кг), n=10	64,1 [59,6 ÷ 78,1] P <sub>5-1</sub> = 0,00394 P <sub>5-2</sub> = 0,00216 P <sub>5-3</sub> = 0,00394 P <sub>5-4</sub> = 0,00216	3,453 [1,905 ÷ 8,927] P <sub>5-1</sub> = 0,00394 P <sub>5-2</sub> = 0,00216 P <sub>5-3</sub> = 0,00394 P <sub>5-4</sub> = 0,00216	20,024 [18,701 ÷ 25,715] P <sub>5-1</sub> = 0,00216 P <sub>5-2</sub> = 0,00394 P <sub>5-3</sub> = 0,00216 P <sub>5-4</sub> = 0,00394
6-ая группа, опыт-4 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n=10	642,9 [584,1 ÷ 760,1] P <sub>6-1</sub> = 0,00394 P <sub>6-2</sub> = 0,00216 P <sub>6-3</sub> = 0,0104 P <sub>6-4</sub> = 0,00394 P <sub>6-5</sub> = 0,00216	8,538 [6,124 ÷ 12,369] P <sub>6-1</sub> = 0,00394 P <sub>6-2</sub> = 0,00216 P <sub>6-3</sub> = 0,00394 P <sub>6-4</sub> = 0,00216 P <sub>6-5</sub> = 0,0163	26,95 [23,564 ÷ 29,01] P <sub>6-1</sub> = 0,00394 P <sub>6-2</sub> = 0,00216 P <sub>6-3</sub> = 0,00394 P <sub>6-4</sub> = 0,00216 P <sub>6-5</sub> = 0,0104
7-ая группа, опыт-5 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10	161,5 [102,1 ÷ 215,4] P <sub>7-1</sub> = 0,00394 P <sub>7-2</sub> = 0,00216 P <sub>7-3</sub> = 0,00394 P <sub>7-4</sub> = 0,00648 P <sub>7-5</sub> = 0,00394 P <sub>7-6</sub> = 0,00394	88,086 [80,113 ÷ 92,128] P <sub>7-1</sub> = 0,00394 P <sub>7-2</sub> = 0,00216 P <sub>7-3</sub> = 0,00394 P <sub>7-4</sub> = 0,000297 P <sub>7-5</sub> = 0,00394 + P <sub>7-6</sub> = 0,00216	38,969 [34,208 ÷ 42,165] P <sub>7-1</sub> = 0,00394 P <sub>7-2</sub> = 0,00216 P <sub>7-3</sub> = 0,00394 P <sub>7-4</sub> = 0,00216 P <sub>7-5</sub> = 0,00394 P <sub>7-6</sub> = 0,00216
8-ая группа, опыт-6 (холод + гексаметоний 20 мг/кг), n=10	13,75 [8,2 ÷ 20,2] P <sub>8-1</sub> = 0,00394 P <sub>8-2</sub> = 0,00216 P <sub>8-3</sub> = 0,00394 P <sub>8-4</sub> = 0,00216 P <sub>8-5</sub> = 0,00394 P <sub>8-6</sub> = 0,00216 P <sub>8-7</sub> = 0,00394	1,671 [0,823 ÷ 2,324] P <sub>8-1</sub> = 0,00394 P <sub>8-2</sub> = 0,00216 P <sub>8-3</sub> = 0,000297 P <sub>8-4</sub> = 0,00394 P <sub>8-5</sub> = 0,0104 P <sub>8-6</sub> = 0,00394 P <sub>8-7</sub> = 0,00216	18,837 [16,504 ÷ 22,237] P <sub>8-1</sub> = 0,00394 P <sub>8-2</sub> = 0,00216 P <sub>8-3</sub> = 0,00394 P <sub>8-4</sub> = 0,00394 P <sub>8-5</sub> = 0,149 P <sub>8-6</sub> = 0,00394 P <sub>8-7</sub> = 0,00216

При определении МЭЖК Арахис введение гексаметония 2 мг/кг вызывало увеличение выраженности МЭЖК Арахис в 2,7 раза, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг и 20 мг/кг вызывали дозозависимое снижение МЭЖК Арахис на 73,1% и 94,7%, соответственно. При определении МЭЖК Эйкоза доза гексаметония 2 мг/кг также вызывала увеличение МЭЖК в 1,23 раза, а введение доз гексаметония 0,2 мг/кг и 20 мг/кг вызывало дозозависимое снижение содержания МЭЖК Эйкоза на 14,5% и 40,3%, соответственно. При оценке содержания МЭЖК DGLA фракции СЖК реципрокность отмечали при сопоставлении результатов групп животных опыт-1 и опыт-5, опыт-6. Доза никотина 0,05 мг/кг повышала выраженность МЭЖК в 1,23 раза, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг снижали МЭЖК DGLA на 63,7% и 96,9%, соответственно.

Реципрокность МЭЖК Арахис фракции СЖК отмечали при сопоставлении данных групп животных опыт-1 и опыт-4, опыт-6 – доза никотина 0,05 мг/кг повышала содержание МЭЖК Арахис в 1,26 раза, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг и 20 мг/кг снижали МЭЖК Арахис на 73,1% и 94,7%, соответственно. Реципрокность МЭЖК Эйкоза фракции СЖК отмечали и при сопоставлении результатов групп животных опыт-1, опыт-2 и опыт-4, опыт-6 – дозы никотина 0,05 мг/кг и 0,5 мг/кг увеличивали МЭЖК Эйкоза в 1,67 и в 2 раза, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг и 20 мг/кг снижали МЭЖК Эйкоза на 14,5% и 40,3%, соответственно. Следовательно, при ведении животным гексаметония и никотина эффекты, трактуемые нами как реципрокность, отмечали при определении МЭЖК DGLA с сопоставлением результатов групп животных опыт-4 и опыт-2, опыт-3; при определении МЭЖК Арахис и сопоставлении данных групп животных опыт-5 и опыт-2, опыт-3; при определении МЭЖК Эйкоза и сопоставлении результатов групп животных опыт-5 и опыт-3.

Таким образом, обобщая данные содержания МЭЖК семейства  $C_{20}$  (МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахис и МЭЖК Эйкоза) фракции СЖК печени можно отметить, что холодовая нагрузка в течение 5 дней приводила к снижению содержания всех 3 МЭЖК семейства  $C_{20}$  фракции СЖК печени. Никотин в предложенных дозах (0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг и 5 мг/кг) разнонаправленно действовал на содержание МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахис и МЭЖК Эйкоза фракции СЖК – доза никотина 0,05 мг/кг увеличивала выраженность МЭЖК семейства  $C_{20}$ , а в дозах 0,5 мг/кг и 5 мг/кг никотин снижал их содержание, за исключением МЭЖК Эйкоза – доза никотина 0,5 мг/кг увеличивала выраженность МЭЖК Эйкоза. Гексаметоний также разнонаправленно действовал на содержание МЭЖК  $C_{20}$  фракции СЖК печени – при определении МЭЖК DGLA доза гексаметония 0,2 мг/кг увеличивала МЭЖК, а в дозах 2 мг/кг и 20 мг/кг гексаметоний вызывал дозозависимое снижение МЭЖК DGLA. Реципрокность отмечали при сопоставлении данных по МЭЖК DGLA фракции СЖК – доза никотина 0,05 мг/кг повышала, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг снижали

выраженность МЭЖК DGLA. Также реципрокность отмечали и при сопоставлении данных по МЭЖК Арахидной фракции СЖК – доза никотина 0,05 мг/кг повышала, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг и 20 мг/кг снижали содержание МЭЖК Арахидной фракции СЖК. Кроме того, реципрокность отмечали и при определении МЭЖК Эйкоза – дозы никотина 0,05 мг/кг и 0,5 мг/кг увеличивали МЭЖК, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг и 20 мг/кг снижали выраженность МЭЖК Эйкоза.

Сопоставляя данные экспериментов по содержанию МЭ PUFAs семейства  $C_{20}$  ОЛ, фракции СЖК печени и введении никотина и гексаметония на фоне 5 дней холода с данными по содержанию МЭ PUFAs семейства  $C_{20}$  ОЛ и фракции СЖК печени и введении пилокарпина и атропина, можно отметить следующее: если в ОЛ печени и введении животным никотина (0,05 мг/кг), гексаметония (2 мг/кг и 20 мг/кг) реципрокность выявляется, то в экспериментах с введением пилокарпина и атропина и определении МЭ PUFAs DGLA, Арахидной, Эйкоза ОЛ печени она не проявляется. Если во фракции СЖК печени и введении пилокарпина и атропина на фоне 5 дней холода реципрокность отмечается в двух МЭЖК – DGLA и Арахидной, и трактуемая реципрокность в МЭЖК Эйкоза, то при введении животным никотина и гексаметония реципрокность отмечается во всех трёх МЭЖК – МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахидной и МЭЖК Эйкоза.

Необходимо напомнить, что эффекты пилокарпина, вводимого на протяжении 5 дней охлаждения животных, и эффекты неостигмина на фоне 3 ч холодовой нагрузки по направлению совпадали – пилокарпин увеличивал выраженность МЭЖК Арахидной фракции СЖК, и неостигмин увеличивал содержание МЭЖК Арахидной во фракции СЖК печени. Никотин же на фоне 5 дней охлаждения животных увеличивал выраженность всех трёх МЭЖК семейства  $C_{20}$  – МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахидной и МЭЖК Эйкоза как в ОЛ, так и во фракции СЖК печени.

Как мы уже отмечали, в работе механизмов, формирующих ПОЛ, наряду с присутствием PUFAs определяющим фактором является и количественное присутствие ТФК тканевой среды, создающего так называемое парциальное напряжение кислорода тканей [24; 87; 181; 494].

Результаты экспериментов показали, что введение животным никотина и гексаметония на фоне 5-дневной холодовой нагрузки и определении ТФК гомогената печени к 30-ой минуте экспериментов приводило к проявлению феномена реципрокности – доза никотина 0,5 мг/кг показывала увеличение содержания ТФК гомогената печени на 3,9%, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг; 2 мг/кг и 20 мг/кг снижали выраженность ТФК на 26%, 7,7% и 26,2%, соответственно. Присутствие реципрокности отмечали и к 3-ей минуте эксперимента – доза никотина 0,5 мг/кг увеличивала содержание ТФК на 3,7%, а доза гексаметония 20 мг/кг уменьшает её на 4,5%, соответственно (табл. 68).

**Табл. 68.** Влияние никотина и гексаметония на содержание триплетной формы кислорода гомогената печени (ммоль  $O_2$ /мл гомогената) и способность гомогената печени продуцировать активные формы кислорода ( $10^{-6}$  ампер/мл гомогената) на 5-й день охлаждения крыс

Показатели	Триплетная форма кислорода на 3-ей минуте опыта	Триплетная форма кислорода на 30-ой минуте опыта	Активные формы кислорода
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	221,9 [219,8 ÷ 224,1]	243,2 [238,6 ÷ 250,1]	7,71 [6,85 ÷ 8,54]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	231,2 [227,6 ÷ 236,3] $P_{2-1} = 0,00216$	299,1 [293,7 ÷ 304,8] $P_{2-1} = 0,00216$	9,86 [9,701 ÷ 10,2] $P_{2-1} = 0,00216$
3-ья группа, опыт-1 (холод + никотин 0,05 мг/кг), n=10	225,7 [222,6 ÷ 228,0] $P_{3-1} = 0,0104$ $P_{3-2} = 0,00648$	284,4 [270,8 ÷ 290,2] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,00216$	10,29 [10,23 ÷ 10,5] $P_{3-1} = 0,000297$ $P_{3-2} = 0,00394$
4-ая группа, опыт-2 (холод + никотин 0,5 мг/кг), n=10	239,9 [237,3 ÷ 242,8] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00394$	310,9 [299,8 ÷ 315,6] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,0104$ $P_{4-3} = 0,00394$	10,42 [10,25 ÷ 10,45] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,262$
5-ая группа, опыт-3 (холод + никотин 5 мг/кг), n=10	227,7 [226,0 ÷ 229,8] $P_{5-1} = 0,00394$ $P_{5-2} = 0,0453$ $P_{5-3} = 0,0781$ $P_{5-4} = 0,0163$	268,1 [260,3 ÷ 271,9] $P_{5-1} = 0,00394$ $P_{5-2} = 0,00216$ $P_{5-3} = 0,00824$ $P_{5-4} = 0,00394$	6,41 [4,61 ÷ 8,24] $P_{5-1} = 0,201$ $P_{5-2} = 0,00394$ $P_{5-3} = 0,00216$ $P_{5-4} = 0,00394$
6-ая группа, опыт-4 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n=10	231,6 [228,6 ÷ 234,5] $P_{6-1} = 0,00394$ $P_{6-2} = 0,810$ $P_{6-3} = 0,00394$ $P_{6-4} = 0,00216$ $P_{6-5} = 0,0163$	221,4 [218,1 ÷ 224,4] $P_{6-1} = 0,00394$ $P_{6-2} = 0,00216$ $P_{6-3} = 0,00394$ $P_{6-4} = 0,00216$ $P_{6-5} = 0,00394$	9,2 [8,87 ÷ 9,43] $P_{6-1} = 0,00394$ $P_{6-2} = 0,00216$ $P_{6-3} = 0,00394$ $P_{6-4} = 0,0216$ $P_{6-5} = 0,00394$
7-ая группа, опыт-5 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10	237,8 [236,8 ÷ 239,2] $P_{7-1} = 0,00394$ $P_{7-2} = 0,00216$ $P_{7-3} = 0,00391$ $P_{7-4} = 0,00655$ $P_{7-5} = 0,00394$ $P_{7-6} = 0,00216$	276,2 [270,4 ÷ 287,0] $P_{7-1} = 0,00394$ $P_{7-2} = 0,00216$ $P_{7-3} = 0,262$ $P_{7-4} = 0,00394$ $P_{7-5} = 0,0104$ $P_{7-6} = 0,00394$	8,1 [7,75 ÷ 8,26] $P_{7-1} = 0,0781$ $P_{7-2} = 0,00394$ $P_{7-3} = 0,00216$ $P_{7-4} = 0,00394$ $P_{7-5} = 0,0373$ $P_{7-6} = 0,00394$
8-ая группа, опыт-6 (холод + гексаметоний 20 мг/кг), n=10	221,0 [219,8 ÷ 222,6] $P_{8-1} = 0,471$ $P_{8-2} = 0,00394$ $P_{8-3} = 0,00507$ $P_{8-4} = 0,00394$ $P_{8-5} = 0,00216$ $P_{8-6} = 0,00394$ $P_{8-7} = 0,00216$	221,0 [219,8 ÷ 222,6] $P_{8-1} = 0,00394$ $P_{8-2} = 0,00216$ $P_{8-3} = 0,201$ $P_{8-4} = 0,00394$ $P_{8-5} = 0,0104$ $P_{8-6} = 0,00394$ $P_{8-7} = 0,811$	7,07 [6,61 ÷ 7,68] $P_{8-1} = 0,0373$ $P_{8-2} = 0,00394$ $P_{8-3} = 0,00216$ $P_{8-4} = 0,00394$ $P_{8-5} = 0,423$ $P_{8-6} = 0,00394$ $P_{8-7} = 0,00216$

В данных 3-ей минуты эксперимента отмечали явление, также трактуемое как реципрокность, – доза никотина 0,05 мг/кг снижала выраженность ТФК на 2,4%, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг и 2 мг/кг, если в первом случае статистически недостоверно, то во втором случае статистически достоверно повышало выраженность ТФК на 2,8%. Следует отметить, что как на 3-ей минуте, так и на 30-ой минуте экспериментов, в группе животных контроль-2 отмечали повышение содержания ТФК гомогената печени.

Описывая материал, связанный со способностью гомогената печени продуцировать АФК при введении животным никотина и гексаметония на фоне 5 дней холодовой нагрузки, отмечали также возникновение реципрокности – если дозы никотина 0,05 мг/кг и 0,5 мг/кг увеличивали способность гомогената печени продуцировать АФК на 4,3% и 5,6%, соответственно, то гексаметоний в дозах 0,2 мг/кг; 2 мг/кг и 20 мг/кг вызывал дозозависимое снижение способности гомогената печени продуцировать АФК. Необходимо отметить, что холодовая нагрузка у животных в течение 5 дней увеличивала способность гомогената печени продуцировать АФК на 27,8%. Данные, полученные при определении ТФК и АФК гомогената печени периода 5 дней холодовой нагрузки и введении животным никотина и гексаметония, свидетельствуют о присутствии реципрокности как при определении ТФК гомогената печени, так и способности гомогената печени продуцировать АФК. Необходимо отметить, что холод 5 дней увеличивал содержание ТФК гомогената печени и увеличивал способность гомогената печени продуцировать АФК.

Сопоставляя полученный материал с данными введения животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней холода, нужно отметить, что если на 3-ей минуте экспериментов в группе животных с введением пилокарпина отмечали снижение содержания ТФК, а в группе животных с введением атропина повышение ТФК, то к 30-ой минуте выявили противоположное – в группе животных с введением пилокарпина содержание ТФК отмечается выше контроля, а в группе животных с атропином ниже контроля; введение же животным никотина приводило к росту содержания ТФК гомогената печени, а введение гексаметония – к снижению ТФК как на 3-ей, так и на 30-ой минуте экспериментов. Следует напомнить, что введение животным неостигмина на фоне 3-часовой холодовой нагрузки приводило к снижению содержания ТФК гомогената печени, но к росту способности гомогената печени продуцировать АФК.

Сопоставляя данные по никотину и гексаметонию при оценке способности гомогената печени продуцировать АФК и по введению животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней холодовой нагрузки отмечали, что пилокарпин и атропин не вызывали проявление реципрокности при определении способности гомогената печени продуцировать АФК, а введение никотина и гексаметония демонстрировали проявление этого феномена. Необходимо отметить, что введение животным неостигмина периода 3-часовой холодовой нагрузки способствовало росту АФК гомогената печени.

Понимая, что введение животным никотина и гексаметония приводило к проявлению реципрокности не только при оценке содержания ТФК гомогената печени и способности гомогената печени продуцировать АФК, мы должны были определить содержание и 2,3-ДФГ эритроцитов крови, трактуемого нами как маркёр поступления кислорода в ткань печени [9; 14; 21; 90]. Результаты экспериментов свидетельствовали, что охлаждение животных периода 5 дней приводило к увеличению содержания 2,3-ДФГ эритроцитов в 1,27 раза. Введение никотина и гексаметония на фоне данного режима охлаждения животных приводило к проявлению реципрокности – доза никотина 0,5 мг/кг увеличивала содержание 2,3-ДФГ эритроцитов в 1,13 раза, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг; 2 мг/кг и 20 мг/кг приводили к уменьшению его содержания на 28,8%; 16,8% и 32,3% при сравнении с данными животных группы контроль-2, соответственно (табл. 69).

**Табл. 69.** Влияние никотина и гексаметония на содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови (мкмоль Р/мл эритроцитов) крыс после 5 дней охлаждения

Показатели	Содержание 2,3-ДФГ
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	12,2 [11,1 ÷ 13,4]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	15,5 [14,8 ÷ 16,1] $P_{2-1} = 0,00216$
3-ья группа, опыт-1 (холод + никотин 0,05 мг/кг), n=10	14,7 [13,2 ÷ 15,2] $P_{3-1} = 0,00648$ $P_{3-2} = 0,0781$
4-ая группа, опыт-2 (холод + никотин 0,5 мг/кг), n=10	17,6 [16,8 ÷ 19,1] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00394$
5-ая группа, опыт-3 (холод + никотин 5 мг/кг), n=10	12,4 [11,8 ÷ 13,7] $P_{5-1} = 0,00394$ $P_{5-2} = 0,0453$ $P_{5-3} = 0,0781$ $P_{5-4} = 0,0163$
6-ая группа, опыт-4 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n=10	11,1 [10,2 ÷ 12,1] $P_{6-1} = 0,0373$ $P_{6-2} = 0,00394$ $P_{6-3} = 0,00216$ $P_{6-4} = 0,00394$ $P_{6-5} = 0,0104$

<p>7-ая группа, опыт-5 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10</p>	<p>12,9  <math>[12,1 \div 14,6]</math>  <math>P_{7-1} = 0,201</math>  <math>P_{7-2} = 0,00394</math>  <math>P_{7-3} = 0,0202</math>  <math>P_{7-4} = 0,00394</math>  <math>P_{7-5} = 0,423</math>  <math>P_{7-6} = 0,00394</math></p>
<p>8-ая группа, опыт-6 (холод + гексаметоний 20 мг/кг), n=10</p>	<p>10,5  <math>[9,2 \div 11,5]</math>  <math>P_{8-1} = 0,0104</math>  <math>P_{8-2} = 0,00394</math>  <math>P_{8-3} = 0,00216</math>  <math>P_{8-4} = 0,00394</math>  <math>P_{8-5} = 0,00216</math>  <math>P_{8-6} = 0,149</math>  <math>P_{8-7} = 0,00394</math></p>

Подводя итог данным, оценивающим содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови и введении животным никотина и гексаметония на фоне 5 дней охлаждения, отмечали проявление реципрокности. Сопоставляя полученные данные с результатами введения пилокарпина и атропина на фоне 5 дней охлаждения животных, отмечали, что если пилокарпин способствовал уменьшению, а атропин увеличению содержания 2,3-ДФГ эритроцитов крови, то доза никотина 0,5 мг/кг увеличивала, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг; 2 мг/кг и 20 мг/кг уменьшали выраженность 2,3-ДФГ эритроцитов крови. Нужно напомнить, что введение неостигмина на фоне 3 ч охлаждения животных уменьшала выраженность 2,3-ДФГ эритроцитов крови.

Данные холодовой нагрузки свидетельствовали, что холод в течение 5 дней увеличивал содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови, а холодовая нагрузка 3 ч снижала содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови.

Как мы уже ранее отмечали, способность тканей продуцировать АФК предрасполагает к возникновению неспаренной валентности аллильно и бис-аллильно расположенных метиленовых групп PUFA's липидов [411], а изменение парциального напряжения в тканях ТФК, предположительно, предопределяет делокализацию двойных связей ненасыщенных компонентов липидов печени с последующим формированием ДК [442].

Так, оценивая содержание ДК ОЛ, фракции СЖК печени и введении никотина и гексаметония на протяжении 5 дней охлаждения животных, было отмечено, что дозы никотина 0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг и 5 мг/кг увеличивали выраженность ДК ОЛ печени. Введение животным гексаметония (2 мг/кг и 20 мг/кг) также способствовало росту содержания ДК ОЛ, но только доза гексаметония 0,2 мг/кг снижала ДК ОЛ печени в 1,13 раза при сравнении с данными животных, подвергавшихся только охлаждению.

Оценка содержания ДК ОЛ отмечает возникновение реципрокности при сопоставлении данных групп животных опыт-1, опыт-2, опыт-3 и опыт-4 – дозы никотина 0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг и 5 мг/кг увеличивали, а доза гексаметония 0,2 мг/кг снижала выраженность ДК ОЛ печени. Оценивая изменения содержания ДК фракции СЖК печени, можно было отметить, что проявление реципрокности не выявили – дозы никотина 0,05 мг/кг и 0,5 мг/кг увеличивали содержание ДК на 50,2% и 3,1%, и дозы гексаметония 0,2 мг/кг; 2 мг/кг и 20 мг/кг также увеличивали выраженность ДК во фракции СЖК печени, соответственно.

Иллюстрируя влияние выбранного режима холодовой нагрузки на содержание ДК фракций липидов печени (фракция ОЛ; фракция СЖК) можно отметить, что холод 5 дней уменьшал содержание ДК ОЛ, но приводил к росту ДК фракции СЖК печени (табл. 70).

**Табл. 70.** Влияние никотина и гексаметония на содержание диеновых конъюгатов общих липидов фракции СЖК печени крыс (нмоль/мг липида) после 5 дней охлаждения

Показатели	Общие липиды	Фракция СЖК
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	112,2 [105,8 ÷ 120,1]	20,908 [19,119 ÷ 22,214]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	102,01 [93,4 ÷ 103,6] P <sub>2-1</sub> = 0,00216	36,755 [35,645 ÷ 38,711] P <sub>2-1</sub> = 0,00216
3-ья группа, опыт-1 (холод + никотин 0,05 мг/кг), n=10	127,4 [117,1 ÷ 135,2] P <sub>3-1</sub> = 0,00648 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	55,203 [51,796 ÷ 64,113] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216
4-ая группа, опыт-2 (холод + никотин 0,5 мг/кг), n=10	296,7 [270,2 ÷ 314,7] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,00394	37,904 [36,962 ÷ 39,563] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,109 P <sub>4-3</sub> = 0,00394
5-ая группа, опыт-3 (холод + никотин 5 мг/кг), n=10	326,6 [280,1 ÷ 399,8] P <sub>5-1</sub> = 0,00394 P <sub>5-2</sub> = 0,00216 P <sub>5-3</sub> = 0,00394 P <sub>5-4</sub> = 0,262	82,626 [76,496 ÷ 95,112] P <sub>5-1</sub> = 0,00394 P <sub>5-2</sub> = 0,00216 P <sub>5-3</sub> = 0,00394 P <sub>5-4</sub> = 0,00216
6-ая группа, опыт-4 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n=10	89,6 [72,8 ÷ 93,4] P <sub>6-1</sub> = 0,00394 P <sub>6-2</sub> = 0,0507 P <sub>6-3</sub> = 0,00394 P <sub>6-4</sub> = 0,00216 P <sub>6-5</sub> = 0,00394	37,581 [35,023 ÷ 39,043] P <sub>6-1</sub> = 0,00394 P <sub>6-2</sub> = 0,423 P <sub>6-3</sub> = 0,00394 P <sub>6-4</sub> = 0,423 P <sub>6-5</sub> = 0,00394

<p>7-ая группа, опыт-5 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10</p>	<p>146,0 [125,6 ÷ 151,3]  <math>P_{7-1} = 0,00394</math>  <math>P_{7-2} = 0,00216</math>  <math>P_{7-3} = 0,0781</math>  <math>P_{7-4} = 0,00394</math>  <math>P_{7-5} = 0,00216</math>  <math>P_{7-6} = 0,00394</math></p>	<p>83,357 [75,613 ÷ 90,247]  <math>P_{7-1} = 0,00394</math>  <math>P_{7-2} = 0,00216</math>  <math>P_{7-3} = 0,00394</math>  <math>P_{7-4} = 0,00216</math>  <math>P_{7-5} = 0,521</math>  <math>P_{7-6} = 0,00394</math></p>
<p>8-ая группа, опыт-6 (холод + гексаметоний 20 мг/кг), n=10</p>	<p>325,5 [264,1 ÷ 365,0]  <math>P_{8-1} = 0,00394</math>  <math>P_{8-2} = 0,00216</math>  <math>P_{8-3} = 0,00348</math>  <math>P_{8-4} = 0,423</math>  <math>P_{8-5} = 0,748</math>  <math>P_{8-6} = 0,00394</math>  <math>P_{8-7} = 0,00216</math></p>	<p>75,581 [64,813 ÷ 83,419]  <math>P_{8-1} = 0,00394</math>  <math>P_{8-2} = 0,00216</math>  <math>P_{8-3} = 0,00394</math>  <math>P_{8-4} = 0,00216</math>  <math>P_{8-5} = 0,0373</math>  <math>P_{8-6} = 0,00394</math>  <math>P_{8-7} = 0,0782</math></p>

Таким образом, введение животным никотина и гексаметония в период 5 дней действия холода приводило к проявлению реципрокности. Данный феномен проявлялся при сопоставлении данных по ДК ОЛ печени – дозы никотина 0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг и 5 мг/кг увеличивали, а доза гексаметония 0,2 мг/кг уменьшала выраженность ДК ОЛ печени. Введение животным никотина и гексаметония на фоне холодовой нагрузки не сопровождалось проявлением реципрокности, определяемой во фракции СЖК печени, – никотин и гексаметоний однонаправленно увеличивали выраженность ДК.

Сопоставляя полученные данные с данными содержания ДК ОЛ, ДК фракции СЖК печени и введения животным пилокарпина и атропина периода 5 дней охлаждения можно напомнить о проявлении следующих фактов: введение пилокарпина увеличивало ДК ОЛ, ДК фракции СЖК печени, и введение никотина также приводило к росту содержания ДК как в ОЛ, так и во фракции СЖК печени. Но, если введение животным атропина вызывало снижение ДК ОЛ до уровня животных, подвергавшихся только охлаждению, и при этом атропин вызывал статистически достоверное снижение содержания ДК фракции СЖК, то только доза гексаметония 0,2 мг/кг вызывала снижение ДК ОЛ и отсутствие снижения ДК во фракции СЖК печени.

Напоминаем о данных, полученных при оценке содержания ДК и введения животным неостигмина на фоне 3-часовой холодовой нагрузки: если действие холода в течении 3 ч увеличивало ДК ОЛ печени, то введение на этом фоне неостигмина (0,2 мг/кг) уменьшало эту выраженность. Холод периода 5 дней снижал ДК ОЛ, а введение на фоне данного режима охлаждения животных никотина увеличивало ДК ОЛ печени. Следует напомнить, что и пилокарпин на фоне 5 дней охлаждения животных увеличивал выраженность ДК ОЛ печени.

Безусловно, наряду с оценкой содержания ДК в липидных структурах мембран клетки необходимо было оценить содержание и ГП в изучаемых фракциях липидов печени.

Поэтому определяя содержание ГП ОЛ, ГП фракции СЖК печени и введении животным никотина и гексаметония периода 5 дней холода, были получены следующие результаты: холод уменьшал содержание ГП ОЛ печени в 1,14 раза, но увеличивал ГП фракции СЖК в 1,86 раза, соответственно. Введение никотина на фоне данного режима охлаждения животных приводило к снижению выраженности ГП ОЛ печени, при этом отмечали дозозависимое изменение содержания ГП ОЛ при сравнении эффектов никотина в группах животных опыт-1 (доза никотина 0,05 мг/кг) и опыт-2 (доза никотина 0,5 мг/кг).

Введение животным гексаметония приводило к противоположному результату – росту содержания ГП ОЛ печени, но проявления дозозависимого эффекта при сравнении результатов групп животных опыт-4, опыт-5 и опыт-6 нами не было отмечено. Сравнивая результаты групп животных опыт-1, опыт-2, опыт-3 и опыт-4, опыт-5, опыт-6 между собой, отмечали присутствие феномена, напоминающего реципрокность, – никотин снижал, а гексаметоний повышал выраженность ГП ОЛ печени. Изменения в содержании ГП фракции СЖК печени и введении животным никотина и гексаметония напоминали изменения при оценке содержания ГП ОЛ печени – никотин (0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг) снижал содержание ГП, за исключением дозы 5 мг/кг, а введение гексаметония приводило к росту ГП фракции СЖК печени. При этом дозозависимое изменение содержания ГП фракции СЖК и введении животным гексаметония отмечали при сравнении результатов групп животных опыт-4 и опыт-5.

Сопоставляя результаты содержания ГП фракции СЖК печени между группами животных опыт-1, опыт-2, опыт-3 и опыт-4, опыт-5, опыт-6 отмечали явление подобное реципрокности – никотин снижал (за исключением дозы никотина 5 мг/кг), а гексаметоний повышал содержание ГП во фракции СЖК печени (табл. 71).

**Табл. 71.** Влияние никотина и гексаметония на содержание гидроперекисей общих липидов, гидроперекисей фракции свободных жирных кислот печени крыс (нмоль/мг липида) после 5 дней охлаждения

Показатели	Общие липиды	Фракция СЖК
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	5,338 [5,202 ÷ 5,625]	0,891 [0,1802 ÷ 0,911]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	4,65 [4,48 ÷ 4,762] P <sub>2-1</sub> = 0,00216	1,661 [1,597 ÷ 1,892] P <sub>2-1</sub> = 0,00216
3-ья группа, опыт-1 (холод + никотин 0,05 мг/кг), n=10	4,01 [3,872 ÷ 4,152] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216	1,581 [1,436 ÷ 1,687] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,0781

4-ая группа, опыт-2 (холод + никотин 0,5 мг/кг), n=10	4,392 [4,115 ÷ 4,508] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00648 P <sub>4-3</sub> = 0,0104	1,205 [1,023 ÷ 1,547] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,0104
5-ая группа, опыт-3 (холод + никотин 5 мг/кг), n=10	4,313 [4,01 ÷ 4,405] P <sub>5-1</sub> = 0,00394 P <sub>5-2</sub> = 0,00216 P <sub>5-3</sub> = 0,0163 P <sub>5-4</sub> = 0,201	5,881 [4,432 ÷ 7,535] P <sub>5-1</sub> = 0,00394 P <sub>5-2</sub> = 0,00216 P <sub>5-3</sub> = 0,00394 P <sub>5-4</sub> = 0,00216
6-ая группа, опыт-4 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n=10	4,902 [4,798 ÷ 5,01] P <sub>6-1</sub> = 0,00394 P <sub>6-2</sub> = 0,00216 P <sub>6-3</sub> = 0,00394 P <sub>6-4</sub> = 0,00216 P <sub>6-5</sub> = 0,00394	3,01 [2,322 ÷ 3,796] P <sub>6-1</sub> = 0,00394 P <sub>6-2</sub> = 0,00216 P <sub>6-3</sub> = 0,00394 P <sub>6-4</sub> = 0,00216 P <sub>6-5</sub> = 0,00394
7-ая группа, опыт-5 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10	4,853 [4,797 ÷ 4,995] P <sub>7-1</sub> = 0,00394 P <sub>7-2</sub> = 0,00216 P <sub>7-3</sub> = 0,00394 P <sub>7-4</sub> = 0,00216 P <sub>7-5</sub> = 0,00394 P <sub>7-6</sub> = 0,423	2,277 [1,906 ÷ 2,475] P <sub>7-1</sub> = 0,00394 P <sub>7-2</sub> = 0,00216 P <sub>7-3</sub> = 0,00394 P <sub>7-4</sub> = 0,00216 P <sub>7-5</sub> = 0,00394 P <sub>7-6</sub> = 0,00648
8-ая группа, опыт-6 (холод + гексаметоний 20 мг/кг), n=10	4,851 [4,724 ÷ 5,126] P <sub>8-1</sub> = 0,00394 P <sub>8-2</sub> = 0,0104 P <sub>8-3</sub> = 0,00394 P <sub>8-4</sub> = 0,00216 P <sub>8-5</sub> = 0,00617 P <sub>8-6</sub> = 0,631 P <sub>8-7</sub> = 0,936	3,089 [2,857 ÷ 3,223] P <sub>8-1</sub> = 0,00394 P <sub>8-2</sub> = 0,00216 P <sub>8-3</sub> = 0,00394 P <sub>8-4</sub> = 0,00216 P <sub>8-5</sub> = 0,00394 P <sub>8-6</sub> = 0,872 P <sub>8-7</sub> = 0,00394

Обобщая результаты по содержанию ГП ОЛ, ГП фракции СЖК печени и введении животным никотина и гексаметония на фоне 5 дней охлаждения, можно отметить явление, подобное реципрокности, как в ОЛ, так и во фракции СЖК печени – никотин снижал, а гексаметоний повышал содержание ГП. Напоминаем, что, сопоставляя полученные данные с изменением содержания ГП ОЛ, ГП фракции СЖК и при введении пилокарпина и атропина на фоне 5 дней холодной нагрузки, отмечали, что пилокарпин уменьшал выраженность ГП ОЛ, а введение атропина увеличивало их в ОЛ печени. Также напоминаем, что введение животным неостигмина на фоне 3 ч холода уменьшало ГП ОЛ печени.

Сравнивая результаты содержания ГП фракции СЖК при введении пилокарпина и атропина, введении никотина и гексаметония на фоне 5 дней холодной нагрузки, необходимо отметить разнонаправленность в действии фармакологических агентов: если пилокарпин увеличивал, то никотин уменьшал, если атропин уменьшал, то гексаметоний увеличивал выраженность ГП фракции СЖК печени.

Определяя короткоцепочечный продукт ПОЛ, содержащий альдегидный кислород, – МДА при введении животным никотина и гексаметония было отмечено, что холод 5 дней увеличивал содержание МДА ткани печени. Введение животным никотина приводило к увеличению выраженности МДА, за исключением применения дозы никотина 0,05 мг/кг. Гексаметоний, вводимый животным на фоне 5 дней холода, также увеличивал содержание МДА, за исключением дозы 2 мг/кг (табл. 72).

**Табл. 72.** Влияние никотина и гексаметония на содержание малонового альдегида ткани печени крыс (нмоль /мл гомогената) после 5 дней охлаждения

Показатели	Малоновый диальдегид
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	1,025 [0,930 ÷ 1,231]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	1,391 [1,307 ÷ 1,572] $P_{2-1} = 0,00216$
3-ья группа, опыт-1 (холод + никотин 0,05 мг/кг), n=10	0,818 [0,741 ÷ 0,860] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,00216$
4-ая группа, опыт-2 (холод + никотин 0,5 мг/кг), n=10	1,965 [1,801 ÷ 2,491] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00394$
5-ая группа, опыт-3 (холод + никотин 5 мг/кг), n=10	2,711 [2,214 ÷ 2,966] $P_{5-1} = 0,00394$ $P_{5-2} = 0,00216$ $P_{5-3} = 0,00394$ $P_{5-4} = 0,0104$
6-ая группа, опыт-4 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n=10	1,749 [1,608 ÷ 1,886] $P_{6-1} = 0,00394$ $P_{6-2} = 0,00216$ $P_{6-3} = 0,00394$ $P_{6-4} = 0,0163$ $P_{6-5} = 0,00394$
7-ая группа, опыт-5 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10	0,595 [0,486 ÷ 0,662] $P_{7-1} = 0,00394$ $P_{7-2} = 0,00216$ $P_{7-3} = 0,00394$ $P_{7-4} = 0,00216$ $P_{7-5} = 0,00394$ $P_{7-6} = 0,00216$
8-ая группа, опыт-6 (холод + гексаметоний 20 мг/кг), n=10	2,366 [2,214 ÷ 2,791] $P_{8-1} = 0,00394$ $P_{8-2} = 0,00216$ $P_{8-3} = 0,00394$ $P_{8-4} = 0,0373$ $P_{8-5} = 0,0926$ $P_{8-6} = 0,00394$ $P_{8-7} = 0,00216$

Несмотря на полученные результаты (дозы никотина 0,5 мг/кг; 5 мг/кг и дозы гексаметония 0,2 мг/кг; 20 мг/кг увеличивали содержание МДА ткани печени), можно было отметить проявление реципрокности при сравне-

нии данных экспериментов между группами животных опыт-2, опыт-3 и опыт-5 – дозы никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг увеличивали, а доза гексаметония 2 мг/кг уменьшала выраженность МДА ткани печени. Сопоставляя данные групп животных опыт-4, опыт-6 и опыт-1 отмечали явление, подобное реципрокности, – доза никотина 0,05 мг/кг уменьшала, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг и 20 мг/кг увеличивали выраженность МДА ткани печени.

Подводя итог данному разделу экспериментов, можно отметить проявление феномена реципрокности при определении МДА ткани печени – дозы никотина 0,5 мг/кг и 5 мг/кг увеличивали, а доза гексаметония 2 мг/кг снижала выраженность МДА. Сопоставляя данные групп животных опыт-4, опыт-6 и опыт-1 можно выделить проявление, подобное реципрокности, – доза никотина 0,05 мг/кг снижала, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг и 20 мг/кг увеличивали содержание МДА печени.

Определяя МДА при введении никотина и гексаметония на фоне 5 дней охлаждения и сопоставляя с данными введения животным пилокарпина и атропина на фоне данного режима охлаждения животных, отмечали, что если никотин (0,5 мг/кг; 5 мг/кг) увеличивал, а гексаметоний (2 мг/кг) снижал содержание МДА ткани печени, то пилокарпин (10 мг/кг) увеличивал, а атропин (1 мг/кг) снижал МДА печени до уровня группы животных контроль-2. Если, в первом случае отмечали проявление реципрокности, то в случае введения пилокарпина и атропина она остаётся под вопросом. Напомним, что при введении атропина (1 мг/кг) выраженность МДА определялась на уровне контроля-2 – животных, подвергавшихся только охлаждению.

Сопоставляя результаты экспериментов с данными введения неостигмина на фоне 3 ч холода, можно было отметить следующее: если 3-часовая холодовая нагрузка не увеличивала содержание МДА, то холод 5 дней приводил к росту МДА ткани печени. Эффекты неостигмина на фоне 3-часовой холодной нагрузки и эффекты никотина (0,5 мг/кг; 5 мг/кг) на фоне 5 дней холода вызывали однонаправленный эффект – увеличивали содержание МДА ткани печени. Эффекты никотина (0,5 мг/кг; 5 мг/кг) и эффекты пилокарпина (10 мг/кг) на фоне 5 дней холода совпадали по направлению – увеличивали содержание МДА ткани печени.

Так, как в предыдущем разделе работы определяли присутствие реципрокности при оценке содержания продуктов ПОЛ МЭРГ (ДК ОЛ МЭРГ, ГП ОЛ МЭРГ, МДА МЭРГ), связанного с введением пилокарпина и атропина, то в данном разделе исследований были выполнены работы по определению присутствия реципрокности в продуктах ПОЛ МЭРГ (ДК ОЛ МЭРГ, ГП ОЛ МЭРГ, МДА МЭРГ) и введении животным никотина и гексаметония на фоне 5 дней холода.

Результаты экспериментов свидетельствовали, что реципрокность проявлялась при оценке содержания только ГП ОЛ МЭРГ: если дозы никотина 0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг и 5 мг/кг снижали содержание ГП ОЛ МЭРГ, и при

этом отмечалось дозозависимое снижение ГП ОЛ, то введение животным дозы гексаметония 20 мг/кг достоверно увеличивало выраженность ГП ОЛ МЭРГ (табл. 73).

**Табл. 73.** Влияние никотина и гексаметония на содержание диеновых конъюгатов, гидроперекисей общих липидов мембран эндоплазматического ретикула гепатоцитов (нмоль/мг липида), малонового диальдегида (нмоль/мл гомогената) водной фазы мембран эндоплазматического ретикула гепатоцитов крыс после 5-дневного охлаждения

Показатели	Диеновые конъюгаты	Гидроперекиси	Малоновый диальдегид
1-ая группа, контроль-1 (интактные), n=10	223,1 [200,3 ÷ 245,6]	8,107 [7,816 ÷ 8,901]	2,706 [2,212 ÷ 2,736]
2-ая группа, контроль-2 (холод), n=10	159,1 [150,2 ÷ 174,8] P <sub>2-1</sub> = 0,00216	6,421 [5,496 ÷ 7,217] P <sub>2-1</sub> = 0,00216	3,109 [2,815 ÷ 3,216] P <sub>2-1</sub> = 0,00216
3-ья группа, опыт-1 (холод + никотин 0,05 мг/кг), n=10	140,4 [123,7 ÷ 149,8] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216	1,741 [1,051 ÷ 2,316] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216	2,400 [2,127 ÷ 2,517] P <sub>3-1</sub> = 0,0373 P <sub>3-2</sub> = 0,00394
4-ая группа, опыт-2 (холод + никотин 0,5 мг/кг), n=10	124,5 [110,2 ÷ 130,3] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,0373	0,863 [0,519 ÷ 1,3188] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,0163	2,235 [2,008 ÷ 2,305] P <sub>4-1</sub> = 0,0163 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,546
5-ая группа, опыт-3 (холод + никотин 5 мг/кг), n=10	134,2 [124,9 ÷ 142,7] P <sub>5-1</sub> = 0,00394 P <sub>5-2</sub> = 0,00216 P <sub>5-3</sub> = 0,471 P <sub>5-4</sub> = 0,0781	0,733 [0,484 ÷ 1,211] P <sub>5-1</sub> = 0,00394 P <sub>5-2</sub> = 0,00216 P <sub>5-3</sub> = 0,00648 P <sub>5-4</sub> = 0,262	2,498 [2,263 ÷ 2,649] P <sub>5-1</sub> = 0,0781 P <sub>5-2</sub> = 0,00394 P <sub>5-3</sub> = 0,378 P <sub>5-4</sub> = 0,0131
6-ая группа, опыт-4 (холод + гексаметоний 0,2 мг/кг), n=10	142,5 [130,2 ÷ 150,1] P <sub>6-1</sub> = 0,00394 P <sub>6-2</sub> = 0,00216 P <sub>6-3</sub> = 0,631 P <sub>6-4</sub> = 0,00648 P <sub>6-5</sub> = 0,00781	0,779 [0,663 ÷ 1,217] P <sub>6-1</sub> = 0,00394 P <sub>6-2</sub> = 0,00216 P <sub>6-3</sub> = 0,00648 P <sub>6-4</sub> = 0,872 P <sub>6-5</sub> = 0,423	2,159 [1,815 ÷ 2,471] P <sub>6-1</sub> = 0,0104 P <sub>6-2</sub> = 0,00394 P <sub>6-3</sub> = 0,0781 P <sub>6-4</sub> = 0,631 P <sub>6-5</sub> = 0,0249
7-ая группа, опыт-5 (холод + гексаметоний 2 мг/кг), n=10	140,0 [131,1 ÷ 150,1] P <sub>7-1</sub> = 0,00394 P <sub>7-2</sub> = 0,00216 P <sub>7-3</sub> = 0,872 P <sub>7-4</sub> = 0,00394 P <sub>7-5</sub> = 0,201 P <sub>7-6</sub> = 0,631	1,159 [0,805 ÷ 1,314] P <sub>7-1</sub> = 0,00394 P <sub>7-2</sub> = 0,00216 P <sub>7-3</sub> = 0,0373 P <sub>7-4</sub> = 0,262 P <sub>7-5</sub> = 0,0373 P <sub>7-6</sub> = 0,0546	2,711 [2,318 ÷ 3,146] P <sub>7-1</sub> = 0,631 P <sub>7-2</sub> = 0,149 P <sub>7-3</sub> = 0,0781 P <sub>7-4</sub> = 0,00394 P <sub>7-5</sub> = 0,201 P <sub>7-6</sub> = 0,0163
8-ая группа, опыт-6 (холод + гексаметоний 20 мг/кг), n=10	142,5 [136,12 ÷ 148,7] P <sub>8-1</sub> = 0,00394 P <sub>8-2</sub> = 0,00216 P <sub>8-3</sub> = 0,631 P <sub>8-4</sub> = 0,00394 P <sub>8-5</sub> = 0,0373 P <sub>8-6</sub> = 0,982 P <sub>8-7</sub> = 0,521	7,481 [5,911 ÷ 8,330] P <sub>8-1</sub> = 0,0781 P <sub>8-2</sub> = 0,149 P <sub>8-3</sub> = 0,00394 P <sub>8-4</sub> = 0,00216 P <sub>8-5</sub> = 0,00394 P <sub>8-6</sub> = 0,00216 P <sub>8-7</sub> = 0,00394	2,269 [2,103 ÷ 2,816] P <sub>8-1</sub> = 0,149 P <sub>8-2</sub> = 0,00648 P <sub>8-3</sub> = 0,366 P <sub>8-4</sub> = 0,423 P <sub>8-5</sub> = 0,149 P <sub>8-6</sub> = 0,336 P <sub>8-7</sub> = 0,0249

Таким образом, определяя проявление феномена реципрокности при оценке содержания продуктов ПОЛ МЭРГ и введении животным никотина и гексаметония на фоне 5 дней холодовой нагрузки, необходимо отметить, что феномен реципрокности (разнонаправленности) отмечали только при определении ГП ОЛ МЭРГ.

Сопоставляя полученные данные с данными, определяющими присутствие реципрокности в продуктах ПОЛ МЭРГ и введении животным пилокарпина и атропина на фоне 5 дней холодовой нагрузки, можно отметить, что введение животным пилокарпина и атропина приводило к проявлению реципрокности при определении содержания ДК ОЛ МЭРГ, ГП ОЛ МЭРГ и МДА водной фазы МЭРГ.

### **5.7. Заключение о результатах влияния никотина и гексаметония на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени, заключение о изменении условий, способствующих развитию ПОЛ печени после 5 дней охлаждения крыс**

Суммируя результаты экспериментов, определяющих изменения содержания продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени и определяющих изменения в условиях, способствующих развитию ПОЛ печени и введении животным никотина и гексаметония периода 5-дневной холодовой нагрузки, можно отметить, что действие холода приводило к уменьшению содержания адреналина ткани печени. Введение животным никотина и гексаметония на фоне 5 дней холода сопровождалось проявлением реципрокности при оценке содержания адреналина гомогената печени – никотин (0,5 мг/кг, 5 мг/кг) повышал, а гексаметоний (0,2 мг/кг) снижал содержание адреналина ткани печени. Были получены и данные, трактуемые как реципрокность, – доза никотина 0,05 мг/кг вызывала снижение, а дозы гексаметония 2 мг/кг и 20 мг/кг приводили к повышению содержания адреналина.

Но холодовая нагрузка, оказывающая влияние на животных 5 дней, сопровождалась увеличением содержания НА ткани печени. Введение никотина и гексаметония на этом фоне охлаждения животных приводило к проявлению реципрокности – никотин (0,5 мг/кг) увеличивал содержание НА, а гексаметоний (2 мг/кг) уменьшал его. Помимо факта реципрокности отмечали и явление, подобное реципрокности, – никотин (0,05 мг/кг; 5 мг/кг) снижал содержание НА, а гексаметоний (0,2 мг/кг; 20 мг/кг) увеличивал его выраженность в ткани печени.

Оценивая йодное число, как в ОЛ печени, так и во фракции СЖК после 5 дней холодовой нагрузки, отмечали, что происходит снижение поступления молекулярного йода в выше перечисленные липидные фазы печени. Введе-

ние животным никотина и гексаметония на фоне данного режима холодовой нагрузки приводило к проявлению реципрокности как в ОЛ, так и во фракции СЖК печени.

Оценивая способность к изменению расположения двойных связей в ненасыщенных компонентах липидов (на примере ЖК  $\Delta 9,12$  C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой) было определено следующее. Холодовая нагрузка 5 дней способствовала количественному уменьшению *cis*-изомеров ЖК, но приводила к увеличению содержания *trans*-изомеров ЖК как в ОЛ, так и во фракции СЖК печени. Введение животным никотина и гексаметония периода 5 дней холода приводило к проявлению реципрокности как в *cis*-, так и в *trans*-изомерах ЖК ОЛ и *trans*-изомерах фракции СЖК печени.

Давая оценку изменениям содержания МЭЖК семейства C<sub>20</sub> (МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахидонової, МЭЖК Эйкозаноїди) было отмечено, что холод 5 дней приводил к количественному уменьшению содержания МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахидонової ОЛ, но сопровождался увеличением МЭЖК Эйкозаноїди ОЛ печени и приводил к уменьшению содержания МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахидонової и МЭЖК Эйкозаноїди фракции СЖК печени. Никотин и гексаметоний на фоне 5-дневного режима холодовой нагрузки приводили к проявлению реципрокности при оценке содержания МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахидонової, МЭЖК Эйкозаноїди ОЛ печени и МЭЖК семейства C<sub>20</sub> фракции СЖК печени (МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахидонової и МЭЖК Эйкозаноїди).

Сопоставляя данные содержания ТФК и способности гомогената печени продуцировать АФК было отмечено, что гомогенат печени животных, подвергавшийся только холодовой нагрузке в течение 5 дней, способен был показывать увеличение содержания ТФК и увеличивал способность гомогената печени продуцировать АФК. Введение животным на этом фоне охлаждения никотина и гексаметония приводило к проявлению реципрокности как при определении ТФК, так и в способности гомогената печени продуцировать АФК. Оценивая содержание ТФК гомогената печени, способности гомогената печени продуцировать АФК было определено содержание и 2,3-ДФГ эритроцитов крови. Холод 5 дней увеличивал содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови. Введение животным никотина и гексаметония на фоне предложенной холодовой нагрузки приводило к проявлению реципрокности при оценке содержания 2,3-ДФГ эритроцитов крови.

Определяя изменения содержания ДК ОЛ, ДК фракции СЖК печени было отмечено, что холод 5 дней уменьшал ДК ОЛ печени, но увеличивал выраженность ДК фракции СЖК. Введение животным никотина и гексаметония на фоне данной холодовой нагрузки приводило к проявлению реципрокности при оценке содержания ДК ОЛ печени и к её отсутствию при определении ДК фракции СЖК печени.

Давая оценку изменениям ГП ОЛ, ГП фракции СЖК печени необходимо было отметить, что 5-дневная холодовая нагрузка животных приводила к снижению содержания ГП ОЛ, но приводила к повышению ГП фракции

СЖК печени. Результаты определения ГП ОЛ и ГП фракции СЖК печени и введении животным никотина и гексаметония на фоне 5 дней охлаждения свидетельствовали о проявлении явления, подобного реципрокности, как в ОЛ, так и во фракции СЖК печени – никотин снижал, а гексаметоний повышал содержание ГП.

Определяя МДА ткани печени отмечали увеличение его содержания после 5 дней холодовой нагрузки, в отличии от действия холода 3 ч. Введение животным никотина и гексаметония периода 5 дней охлаждения приводило к проявлению реципрокности – никотин (0,5 мг/кг и 5 мг/кг) увеличивал, а гексаметоний (2 мг/кг) уменьшал выраженность МДА. Наряду с этими данными получены были получены и результаты, трактуемые как реципрокность, – никотин (0,05 мг/кг) снижал, а гексаметоний (0,2 мг/кг и 20 мг/кг) увеличивал выраженность МДА ткани печени. Проявление феномена, подобного реципрокности, установлено и при определении содержания ГП ОЛ МЭРГ – никотин уменьшал, а гексаметоний увеличивал выраженность ГП ОЛ МЭРГ.

Таким образом, созданием модели холодового стресса у животных было индуцировано ПОЛ печени. Введением фармакологических агентов никотина и гексаметония было обнаружено проявление феномена реципрокности при оценке содержания продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ и при оценке условий, способствующих формированию ПОЛ печени.

Но по-прежнему оставался нерешённым вопрос возможного влияния на содержание продуктов ПОЛ печени химических элементов структур никотина и гексаметония и способных под влиянием редокс-цепей ткани печени индуцировать переменную валентность, влияя тем самым на содержание продуктов ПОЛ печени. Для получения ответа на возникающие вопросы, нами были проведены эксперименты по активированию ПОЛ *in vitro* ферментативными и ферментативными механизмами в присутствии никотина и гексаметония и с микросомами печени инкубационной среды. Выяснению этого вопроса и посвящён следующий раздел работы.

## **5.8. Результаты индуцирования ПОЛ микросом печени *in vitro* неферментативными (аскорбатзависимыми) и ферментативными (NADP•H-зависимыми) механизмами в присутствии никотина и гексаметония**

В разделах работы с введением животным прямого Н-холиномиметика никотина и Н-холиноблокатора гексаметония решался вопрос о влиянии выше перечисленных фармакологических агентов на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени, выяснялся вопрос о изменении условий, способствующих развитию ПОЛ печени и вопрос о проявлении реципрокности. Затрагивался при этом вопрос и о способности

химических элементов структуры никотина и гексаметония под влиянием редокс-цепей печени оказывать влияние на формирование процесса ПОЛ печени.

Выяснение вопроса о возможной способности химических элементов, входящих в структуры никотина и гексаметония влиять на ПОЛ печени заставило провести нас ряд экспериментов, посвящённых оценке способности липидов микросом печени подвергаться одноэлектронному окислению и восстановлению при индуцировании ферментативных и неферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* и раздельном присутствии никотина и гексаметония в инкубационной среде.

Результаты экспериментов *in vitro* показали, что никотин в инкубационной среде мольной концентрации  $10^{-4}$  М;  $10^{-5}$  М и  $10^{-6}$  М и индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ приводил к уменьшению окисления липидов микросом печени, и по мере уменьшения мольной концентрации никотина в инкубационной среде способность липидов микросом печени к окислению возрастала (табл. 74).

**Табл. 74.** Влияние никотина ( $10^{-4}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М) на ферментативное (NADP•Н-зависимое) окисление липидов микросом печени крыс *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Никотин $10^{-4}$ М	Никотин $10^{-5}$ М	Никотин $10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб $\Delta E_{MDA}$ микросом, n=10	0,380 [0,232 ÷ 0,468]	0,367 [0,221 ÷ 0,441]	0,382 [0,211 ÷ 0,401]
	2-ая групп проб $\Delta E_{MDA}$ микросом + никотин, n=10	0,463 [0,386 ÷ 0,552] $P_{2-1} = 0,179$	0,513 [0,496 ÷ 0,552] $P_{2-1} = 0,00216$	0,351 [0,304 ÷ 0,386] $P_{2-1} = 0,699$
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб $\Delta E_{MDA}$ микросом, n=10	2,720 [2,601 ÷ 2,822] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,00216$	2,646 [2,604 ÷ 2,704] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,00216$	2,702 [2,636 ÷ 2,822] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,00216$
	4-ая группа проб $\Delta E_{MDA}$ микросом + никотин, n=10	2,007 [1,908 ÷ 2,125] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00394$	2,343 [2,235 ÷ 2,456] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00394$	2,362 [2,206 ÷ 2,415] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00394$
Окислительная активность никотина		+34,5% [+26,5 ÷ +38,1]	+20,3% [+15,6 ÷ +27,6]	+16,0% [+11,6 ÷ +20,4]

Никотин в инкубационной среде после тепловой обработки микросом печени приводил к более выраженному уменьшению способности липидов микросом к окислению при индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ (табл. 75).

## Не-нейрональный ацетилхолин печени

**Табл. 75.** Влияние никотина ( $10^{-4}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М) на ферментативное (NADP•Н-зависимое) окисление липидов печени крыс после тепловой обработки микросом *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Никотин $10^{-4}$ М	Никотин $10^{-5}$ М	Никотин $10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ΔЕмда микросом, n=10	1,740 [1,021 ÷ 1,118]	1,082 [1,026 ÷ 1,121]	1,080 [1,031 ÷ 1,116]
	2-ая групп проб ΔЕмда микросом + никотин, n=10	1,359 [1,308 ÷ 1,499] $P_{2-1} = 0,00216$	1,331 [1,297 ÷ 1,380] $P_{2-1} = 0,00216$	1,268 [1,242 ÷ 1,297] $P_{2-1} = 0,00216$
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ΔЕмда микросом, n=10	1,499 [1,412 ÷ 1,545] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,0306$	1,509 [1,503 ÷ 1,512] $P_{3-1} = 0,00216$ $P_{3-2} = 0,00394$	1,502 [1,481 ÷ 1,548] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,00216$
	4-ая группа проб ΔЕмда микросом + никотин, n=10	1,189 [1,148 ÷ 1,219] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00394$	1,342 [1,325 ÷ 1,352] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,926$ $P_{4-3} = 0,00394$	1,337 [1,325 ÷ 1,352] $P_{4-1} = 0,00394$ $P_{4-2} = 0,00216$ $P_{4-3} = 0,00394$
Окислительная активность никотина		+163,6% [+146,8 ÷ +264,9]	+97,4% [+69,5 ÷ +105,7]	+83,3% [+74,5 ÷ +93,7]

Гексаметоний в инкубационной среде с микросомами печени, не подвергавшимися тепловой обработке, в отличие от никотина, приводил к противоположному эффекту – к увеличению окисления липидов микросом печени при активации ферментативных механизмов ПОЛ, и по мере уменьшения мольной концентрации гексаметония инкубационной среды способность липидов микросом печени к окислению также возрастала (табл. 76).

**Табл. 76.** Влияние гексаметония ( $10^{-4}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М) на ферментативное (NADP•Н – зависимое) окисление липидов микросом печени крыс *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Гексаметоний $10^{-4}$ М	Гексаметоний $10^{-5}$ М	Гексаметоний $10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ΔЕмда микросом, n=10	0,403 [0,358 ÷ 0,469]	0,402 [0,358 ÷ 0,469]	0,402 [0,358 ÷ 0,469]
	2-ая групп проб ΔЕмда микросом + гексаметоний, n=10	0,126 [0,112 ÷ 0,138] $P_{2-1} = 0,00394$	0,171 [0,165 ÷ 0,181] $P_{2-1} = 0,00394$	0,112 [0,106 ÷ 0,124] $P_{2-1} = 0,00394$

Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ΔЕМДА микросом, n=10	10,165 [9,645 ÷ 11,812] P <sub>3-1</sub> = 0,004 P <sub>3-2</sub> = 0,0448	10,105 [9,645 ÷ 11,812] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00421	10,165 [9,645 ÷ 11,812] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,0151
	4-ая группа проб ΔЕМДА микросом + гексаметоний, n=10	10,890 [9,906 ÷ 11,912] P <sub>4-1</sub> = 0,00216 P <sub>4-2</sub> = 0,00191 P <sub>4-3</sub> = 0,145	11,053 [10,107 ÷ 12,01] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00245 P <sub>4-3</sub> = 0,262	11,901 [10,769 ÷ 12,561] P <sub>4-1</sub> = 0,0256 P <sub>4-2</sub> = 0,0001 P <sub>4-3</sub> = 0,00865
Окислительная активность гексаметония		- 4,62% [- 0,75 ÷ -10,7]	- 8,76% [-4,43 ÷ - 16,5]	-12,2% [- 4,9 ÷ - 22,4]

Ферментативное окисление липидов микросом, подвергавшихся тепловой процедуре и находившихся с гексаметонием в инкубационной среде, меняло направление окисления – липиды микросом становились менее чувствительны к ПОЛ, и с уменьшением мольной концентрации гексаметония инкубационной среды эта тенденция возрастала (табл. 77).

**Табл. 77.** Влияние гексаметония ( $10^{-4}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М) на ферментативное (NADP•Н-зависимое) окисление липидов печени крыс после тепловой обработки микросом *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Гексаметоний $10^{-4}$ М	Гексаметоний $10^{-5}$ М	Гексаметоний $10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ΔЕМДА микросом, n =10	0,787 [0,745 ÷ 0,883]	0,806 [0,751 ÷ 0,881]	0,812 [0,751 ÷ 0,881]
	2-ая групп проб ΔЕМДА микросом + гексаметоний, n=10	0,849 [0,812 ÷ 0,884] P <sub>2-1</sub> = 0,179	0,834 [0,800 ÷ 0,883] P <sub>2-1</sub> = 0,240	0,761 [0,745 ÷ 0,772] P <sub>2-1</sub> = 0,0931
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ΔЕМДА микросом, n=10	1,225 [1,214 ÷ 1,232] P <sub>3-1</sub> = 0,00216 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	1,227 [1,210 ÷ 1,242] P <sub>3-1</sub> = 0,00216 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	1,235 [1,200 ÷ 1,246] P <sub>3-1</sub> = 0,00216 P <sub>3-2</sub> = 0,00394
	4-ая группа проб ΔЕМДА микросом + гексаметоний, n=10	1,259 [1,242 ÷ 1,272] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,00394	1,034 [0,966 ÷ 1,108] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,00394	0,884 [0,828 ÷ 0,938] P <sub>4-1</sub> = 0,109 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,00216
Окислительная активность гексаметония		+ 2,82% [-27,1 ÷ +17,9]	+ 59,9% [+7,6 ÷ +83,1]	+71,4% [+53,2 ÷ +82,9]

Таким образом, индуцирование ферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* в присутствии никотина в инкубационной среде уменьшала способность липидов микросом печени к окислению, но по мере уменьшения мольной концентрации никотина инкубационной среды отмечали увеличение способности липидов микросом печени к окислению. Тепловая инактивация белковых компонентов микросом печени более выражено уменьшала способность липидов микросом печени к окислению в присутствии никотина.

Гексаметоний инкубационной среды с микросомами печени, не подвергавшихся тепловой обработке, приводил к противоположному по отношению к никотину эффекту – увеличению способности липидов микросом печени к окислению; отмечали также, что уменьшение мольной концентрации гексаметония инкубационной среды приводило также, как и в случае с никотином, к увеличению способности липидов микросом к окислению.

Окисление липидов микросом, подвергавшихся тепловой обработке, в присутствии гексаметония и индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ, также меняло направление окисления липидов – липиды микросом печени становились менее чувствительны к окислению.

Тепловая обработка микросом печени как в случае с никотином, так и в случае с гексаметонием, меняла направление окисления липидов микросом при индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ *in vitro*.

Индуцирование же неферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* приводило к противоположным результатам – присутствие никотина инкубационной среды мольной концентрации  $10^{-4}$  М,  $10^{-5}$  М и  $10^{-6}$  М увеличивало окисление липидов микросом печени, и уменьшение мольной концентрации никотина инкубационной среды сопровождалось уменьшением окисления липидов микросом (табл. 78).

**Табл. 78.** Влияние никотина ( $10^{-4}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М) на неферментативное (аскорбатзависимое) окисление липидов микросом *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Никотин $10^{-4}$ М	Никотин $10^{-5}$ М	Никотин $10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ΔЕмда микросом, n=10	0,506 [0,386 ÷ 0,635]	0,506 [0,386 ÷ 0,635]	0,506 [0,386 ÷ 0,635]
	2-ая групп проб ΔЕмда микросом + никотин, n=10	0,536 [0,524 ÷ 0,552] $P_{2-1} = 0,961$	0,601 [0,542 ÷ 0,717] $P_{2-1} = 0,309$	0,701 [0,662 ÷ 0,772] $P_{2-1} = 0,00216$
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ΔЕмда микросом, n=10	0,536 [0,524 ÷ 0,552] $P_{2-1} = 0,961$	9,769 [8,391 ÷ 11,04] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,00216$	9,769 [8,391 ÷ 11,04] $P_{3-1} = 0,00394$ $P_{3-2} = 0,00216$

	4-ая группа проб ДЕМДА микросом + никотин, n=10	13,138 [10,819 ÷ 14,214] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,00648	11,069 [8,501 ÷ 11,647] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,936	10,451 [9,812 ÷ 10,911] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,262
Окислительная активность никотина		-40,8% [-76,5 ÷ +3,6]	-12,8% [-24,6 ÷ - 0,36]	-0,352% [-9,64 ÷ +6,15]

Тепловая обработка микросом печени также меняла направление окисления липидов в присутствии никотина, если никотин инкубационной среды мольной концентрации  $10^{-4}$  М увеличивал окисление липидов микросом на 5,8%, то мольные концентрации никотина  $10^{-5}$  М и  $10^{-6}$  М вызывали уменьшение окисления липидов на 1,9% и 0,245%, соответственно (табл. 79).

**Табл. 79.** Влияние никотина ( $10^{-4}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М) на неферментативное (аскорбатзависимое) окисление липидов печени крыс, подвергавшихся тепловой обработке микросом *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Никотин $10^{-4}$ М	Никотин $10^{-5}$ М	Никотин $10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб ДЕМДА микросом, n=10	0,941 [0,936 ÷ 0,966]	0,956 [0,938 ÷ 0,966]	0,956 [0,94 ÷ 0,966]
	2-ая групп проб ДЕМДА микросом + никотин, n=10	1,012 [0,993 ÷ 1,076] P <sub>2-1</sub> = 0,00216	0,968 [0,938 ÷ 0,993] P <sub>2-1</sub> = 0,393	0,959 [0,855 ÷ 1,028] P <sub>2-1</sub> = 0,00216
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ДЕМДА микросом, n=10	13,808 [13,386 ÷ 14,186] P <sub>3-1</sub> = 0,00216 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	13,813 [13,386 ÷ 14,186] P <sub>3-1</sub> = 0,00216 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	13,863 [13,386 ÷ 14,186] P <sub>3-1</sub> = 0,00394 P <sub>3-2</sub> = 0,00216
	4-ая группа проб ДЕМДА микросом + никотин, n=10	14,641 [14,076 ÷ 15,014] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,0163	13,571 [13,303 ÷ 13,689] P <sub>4-1</sub> = 0,00216 P <sub>4-2</sub> = 0,00394 P <sub>4-3</sub> = 0,393	13,912 [13,231 ÷ 14,242] P <sub>4-1</sub> = 0,00394 P <sub>4-2</sub> = 0,00216 P <sub>4-3</sub> = 0,262
Окислительная активность никотина		-5,8% [-11,1 ÷ -5,13]	+1,9% [- 2,4 ÷ + 6,8]	+0,245% [-1,35 ÷ +0,48]

Присутствие гексаметония в инкубационной среде с микросомами печени, не подвергавшимися тепловой обработке и индуцированию неферментативных механизмов ПОЛ, уменьшало способность липидов микросом печени к окислению. Снижение мольной концентрации гексаметония *in vitro* приводило к уменьшению окисления липидов микросом печени (табл. 80).

**Табл. 80.** Влияние гексаметония ( $10^{-4}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М) на неферментативное (аскорбатзависимое) окисление липидов микросом печени крыс *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Гексаметоний $10^{-4}$ М	Гексаметоний $10^{-5}$ М	Гексаметоний $10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб $\Delta E_{MDA}$ микросом, n=10	0,034 [0,03 ÷ 0,041]	0,034 [0,03 ÷ 0,041]	0,034 [0,03 ÷ 0,041]
	2-ая групп проб $\Delta E_{MDA}$ микросом + гексаметоний, n=10	0,275 [0,221 ÷ 0,303] $P_{2-1} = 0,00394$	0,349 [0,248 ÷ 0,496] $P_{2-1} = 0,00216$	0,361 [0,352 ÷ 0,366] $P_{2-1} = 0,00394$
Содержание МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб $\Delta E_{MDA}$ микросом, n=10	20,471 [20,118 ÷ 20,61] $P_{3-1} = 0,0001$ $P_{3-2} = 0,0197$	20,471 [20,118 ÷ 20,608] $P_{3-1} = 0,0001$ $P_{3-2} = 0,0197$	20,471 [20,118 ÷ 20,608] $P_{3-1} = 0,0003$ $P_{3-2} = 0,0197$
	4-ая группа проб $\Delta E_{MDA}$ микросом + гексаметоний, n=10	19,384 [19,209 ÷ 19,411] $P_{4-1} = 0,0197$ $P_{4-2} = 0,00394$ $P_{4-3} = 0,00216$	18,907 [18,657 ÷ 19,112] $P_{4-1} = 0,0197$ $P_{4-2} = 0,00394$ $P_{4-3} = 0,00216$	16,964 [16,275 ÷ 17,69] $P_{4-1} = 0,0197$ $P_{4-2} = 0,00394$ $P_{4-3} = 0,00216$
Окислительная активность гексаметония		+ 6,15% [+4,8 ÷ +7,4]	+ 9,47% [+7,47 ÷ +10,4]	+18,4% [+15,4 ÷ +21,8]

Проведенная тепловая обработка микросом печени приводила к изменению направления окисления липидов микросом в присутствии гексаметония: так, если мольная концентрация гексаметония инкубационной среды  $10^{-4}$  М приводила к уменьшению окисления липидов на 0,52%, то мольные концентрации гексаметония  $10^{-5}$  М и  $10^{-6}$  М увеличивали способность липидов микросом печени к окислению на 2,9% и 3,75%, соответственно (табл. 81)

**Табл. 81.** Влияние гексаметония ( $10^{-4}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-6}$  М) на неферментативное (аскорбатзависимое) окисление липидов микросом печени крыс после тепловой обработки *in vitro* (содержание малонового диальдегида, нмоль/мг белка)

Показатели		Гексаметоний $10^{-4}$ М	Гексаметоний $10^{-5}$ М	Гексаметоний $10^{-6}$ М
Содержание МДА в пробах до окисления липидов микросом	1-ая группа проб $\Delta E_{MDA}$ микросом, n=10	0,403 [0,386 ÷ 0,414]	0,403 [0,386 ÷ 0,414]	0,403 [0,386 ÷ 0,414]

	2-ая групп проб ΔЕМДА микросом + гексаметоний, n=10	1,003 [0,966 ÷ 1,101] P <sub>2-1</sub> = 0,00216	0,700 [0,690 ÷ 0,745] P <sub>2-1</sub> = 0,00394	0,607 [0,600 ÷ 0,613] P <sub>2-1</sub> = 0,00394
Содержа- ние МДА в пробах после окисления липидов микросом	3-ья группа проб ΔЕМДА ми- крсом, n=10	10,411 [10,35 ÷ 10,608] P <sub>3-1</sub> = 0,0197 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	10,411 [10,35 ÷ 10,608] P <sub>3-1</sub> = 0,0197 P <sub>3-2</sub> = 0,00394	10,411 [10,35 ÷ 10,608] P <sub>3-1</sub> = 0,0197 P <sub>3-2</sub> = 0,00394
	4-ая группа проб ΔЕМДА микросом + гексаметоний, n=10	11,054 [10,902 ÷ 11,182] P <sub>4-1</sub> = 0,0001 P <sub>4-2</sub> = 0,000297 P <sub>4-3</sub> = 0,00394	11,013 [11,0 ÷ 11,108] P <sub>4-1</sub> = 0,0006 P <sub>4-2</sub> = 0,000297 P <sub>4-3</sub> = 0,00394	11,04 [10,908 ÷ 11,275] P <sub>4-1</sub> = 0,0001 P <sub>4-2</sub> = 0,00197 P <sub>4-3</sub> = 0,00394
Окислительная активность гексаметония		+ 0,52% [- 1,1 ÷ + 2,5]	- 2,9% [- 2,03 ÷ - 3,2]	- 3,75% [- 2,8 ÷ - 6,6]

Таким образом, индуцирование ферментативных и неферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* и в присутствии никотина и гексаметония приводили к противоположным по направлению результатам окисления липидов микросом печени. Никотин в инкубационной среде при индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ уменьшал окисление липидов микросом печени, а снижение мольной концентрации никотина увеличивало способность липидов микросом к окислению. Тепловая обработка микросом печени не меняла направление окисления липидов в присутствии никотина – отмечали лишь уменьшение окисления липидов микросом печени.

Гексаметоний в инкубационной среде при индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ приводил к увеличению окисления липидов микросом, причём уменьшение мольной концентрации гексаметония инкубационной среды сопровождалось увеличением способности липидов микросом печени к окислению. Тепловая обработка микросом печени и присутствие гексаметония инкубационной среды приводило к изменению направлений окисления липидов – не увеличивалась способность липидов микросом печени к окислению при мольной концентрации гексаметония  $10^{-4}$  М, а в мольной концентрации  $10^{-5}$  М и  $10^{-6}$  М гексаметоний выраженно снижал способность липидов микросом печени к окислению. Активация же неферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* и присутствие никотина и гексаметония также приводила к противоположным по направлению эффектам – никотин способствовал увеличению окисления липидов микросом печени, а гексаметоний препятствовал этому.

Уменьшение мольной концентрации никотина и гексаметония в инкубационной среде приводило в случае никотина – к уменьшению окисления липидов микросом, а в случае гексаметония – к уменьшению способности липидов микросом печени к окислению.

Тепловая обработка микросом печени показала, что как в случае с никотином, так и в случае с гексаметонием, окисление липидов микросом при индуцировании неферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* меняет своё направление: никотин мольной концентрации  $10^{-4}$  М показывал невыраженную прооксидантную активность, а в мольных концентрациях  $10^{-5}$  М и  $10^{-6}$  М не выражено, но препятствует окислительной активности неферментативных механизмов ПОЛ. Гексаметоний мольной концентрации  $10^{-4}$  М слабо уменьшал способность липидов к окислению, а в мольных концентрациях  $10^{-5}$  М и  $10^{-6}$  М увеличивал способность липидов микросом печени к окислению.

## **5.9. Заключение по сопоставлению результатов ПОЛ печени, полученных при введении животным никотина и гексаметония при 5-дневном охлаждении.**

### **Заключение по окислению липидов микросом печени в присутствии никотина и гексаметония *in vitro***

Сопоставляя результаты ПОЛ печени периода 5-дневных холодовых нагрузок на фоне введения животным никотина и гексаметония с результатами ПОЛ, индуцированного ферментативными и неферментативными механизмами *in vitro* в присутствии никотина и гексаметония, отмечали, что направленность при оценке содержания продуктов ПОЛ, полученных *in vivo*, и результаты ПОЛ *in vitro* в присутствии никотина и гексаметония так же, как и в случае с пилокарпином и атропином, противоположна. Так, введение животным никотина на фоне 5 дней холодовой нагрузки увеличивало содержание ДК ОЛ, ДК фракции СЖК печени, увеличивало МДА ткани печени. При этом никотин увеличивал содержание и субстратных составляющих ПОЛ печени: отмечали увеличение содержания МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахидонової, МЭЖК Эйкоза ОЛ и фракции СЖК печени; увеличивалось содержание ТФК гомогената печени, определяемой как на 30-ой, так и к 3-ей минуте экспериментов; увеличивалась способность гомогената печени продуцировать АФК; изменялось содержание и 2,3-ДФГ эритроцитов крови. На примере ЖК  $\Delta^9,12$  C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой показана способность никотина увеличивать содержание *trans*-изомеров ЖК ОЛ и фракции СЖК печени. Присутствие же никотина в инкубационной среде и индуцировании ПОЛ *in vitro* ферментативными механизмами уменьшало окисление липидов микросом печени, а тепловая инактивация белка липидов микросом печени увеличивала способность никотина препятствовать окислению липидов печени.

Введение животным гексаметония (0,2 мг/кг) на фоне 5 дней холодовой нагрузки уменьшало содержание ДК ОЛ печени, уменьшало выраженность МДА ткани печени, при этом снижалось содержание и субстратов обеспечи-

вающих ПОЛ печени – происходило уменьшение содержания МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахидоновой кислоты, МЭЖК Эйкоза ОЛ и МЭЖК DGLA фракции СЖК печени. В дозах 0,2 мг/кг и 20 мг/кг гексаметоний снижал МЭЖК Арахидоновой кислоты и МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени, уменьшал содержание ТФК гомогената печени на 30-ой минуте и в дозе 20 мг/кг – к 3-ей минуте экспериментов. Гексаметоний снижал способность гомогената печени продуцировать АФК и уменьшал выраженность 2,3-ДФГ эритроцитов крови. Отмечали уменьшение содержания *trans*-изомеров ОЛ и *trans*-изомеров фракции СЖК печени.

При индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* присутствие гексаметония в инкубационной среде вызывало противоположный эффект по направлению, чем результаты, полученные *in vivo*, – гексаметоний вызывал усиление окисления липидов микросом печени.

Таким образом, сопоставление результатов ПОЛ, полученных *in vivo*, и ПОЛ, индуцированного *in vitro* ферментативными механизмами, свидетельствуют о разнонаправленности окисления липидов печени, возникающего в присутствии никотина и гексаметония.

Сопоставление результатов, полученных *in vivo* (при определении ДК), с результатами ПОЛ, индуцированного *in vitro* неферментативными механизмами, в присутствии никотина и гексаметония свидетельствуют о совпадении результатов окисления липидов: никотин *in vitro* и индуцировании неферментативных механизмов ПОЛ усиливал окисление липидов микросом печени, а результаты экспериментов, полученные *in vivo*, свидетельствовали, что никотин (0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг; 5 мг/кг), также увеличивал выраженность ДК ОЛ печени.

Гексаметоний и индуцирование неферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* уменьшало окисление липидов микросом печени, и *in vivo* доза гексаметония 0,2 мг/кг приводила к уменьшению содержания ДК ОЛ печени, но дозы 2 мг/кг и 20 мг/кг гексаметония *in vivo* увеличивали содержание ДК ОЛ печени.

Сопоставляя результаты ГП ОЛ печени, полученные *in vivo*, с результатами окисления липидов микросом печени *in vitro* и присутствии никотина и гексаметония, можно отметить несовпадение результатов окисления липидов. Так, никотин (0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг; 5 мг/кг) *in vivo* снижал содержание ГП ОЛ, ГП фракции СЖК печени (напоминаем, *in vitro* при индуцировании неферментативных механизмов окисления липидов никотин усиливал окисление липидов микросом печени), а гексаметоний (0,2 мг/кг; 2 мг/кг; 20 мг/кг) *in vivo* увеличивал выраженность ГП ОЛ, ГП фракции СЖК печени (*in vitro* гексаметоний при активации неферментативных механизмов уменьшал окисление липидов микросом печени).

Сопоставляя данные по содержанию МДА гомогената печени и введении животным никотина и гексаметония с данными по окислению липидов микросом печени *in vitro* в присутствии никотина и гексаметония и индуцировании неферментативных механизмов ПОЛ, можно также отметить не-

совпадение результатов окисления липидов – никотин (0,05 мг/кг; 5 мг/кг) *in vivo* увеличивал содержание МДА, а гексаметоний (0,2 мг/кг) *in vivo* снижал содержание МДА ткани печени. При этом были получены результаты, которые свидетельствуют и об обратном: никотин (0,5 мг/кг) *in vivo* уменьшал содержание МДА, а гексаметоний (0,2 мг/кг и 20 мг/кг) увеличивал выраженность МДА ткани печени, и на этом отрезке исследований данные, полученные *in vivo* и введении животным никотина и гексаметония, не совпадают по направлению с данными окисления липидов микросом, полученных *in vitro* и индуцировании неферментативных механизмов ПОЛ.

Сопоставляя данные о влиянии никотина и гексаметония на содержание ГП ОЛ МЭРГ *in vivo* с данными по окислению липидов микросом печени в присутствии никотина и гексаметония *in vitro* и индуцировании неферментативных механизмов ПОЛ, отмечали также несоответствие направлений результатов окисления липидов – никотин (0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг; 5 мг/кг) *in vivo* снижал содержание ГП ОЛ МЭРГ, хотя *in vitro* никотин при индуцировании неферментативных механизмов ПОЛ усиливал окисление липидов микросом печени, а гексаметоний (20 мг/кг) *in vivo* повышал выраженность ГП ОЛ МЭРГ. Гексаметоний *in vitro* мольной концентрации, соответствующей вводимой животному дозе гексаметония, уменьшал окисление липидов микросом печени.

Таким образом, сопоставление результатов ПОЛ печени *in vivo* при введении животным никотина и гексаметония периода 5-дневных холодовых нагрузок и результатов ПОЛ микросом печени *in vitro*, индуцированного неферментативными и ферментативными механизмами в присутствии никотина и гексаметония, приводят к выводу, что увеличение и снижение содержания продуктов ПОЛ печени объяснить участием только химических элементов структур никотина и гексаметония не представляется возможным. Как одно из возможных предположений, высказывается мнение о возможном изменении содержания продуктов ПОЛ печени через периферические никотиночувствительные лиганд-проводящие ацетилхолиновые участки ионных каналов плазматической мембраны гепатоцитов.

### 5.10. Резюме к главе 5

Как мы уже отмечали, изучению влияния стресс-факторов внешней среды на биологический объект придаётся большое значение [109]. Было отмечено, что одним из таких стресс-факторов окружающей среды, действующим на организм человека, является длительное действие низких температур [1; 44; 52].

Заключение по проведенной работе, выясняющей способность mAChRs гепатоцитов влиять на изменение содержания продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ, влиять на изменение условий, способствующих развитию ПОЛ печени периода холодовых нагрузок, нами было описано выше,

но обобщение результатов в способности nAChRs гепатоцитов влиять на изменение содержания продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ, влиять на изменение условий, способствующих развитию ПОЛ печени периода холодных нагрузок нами не было сделано. Поэтому подведению итогов исследований по nAChRs мы начали с ознакомления с результатом метода возбуждения периферических nAChRs плазматической мембраны гепатоцитов эндогенным АХ. С этой целью, перед ознакомлением результатов применения неостигмина на фоне М-холиноблокатора, необходимо было ознакомиться с результатами экспериментов применения самого М-холиноблокатора. Результатом сопоставления данных, полученных *in vivo*, и данных по окислению липидов *in vitro* в качестве М-холиноблокатора, применяемого перед введением неостигмина, нами был взят фармакологический агент метацин.

Применение неостигмина на фоне метацина (0,01 мг/кг) периода 3-часового охлаждения животных показало увеличение содержания ДК ОЛ, ГП ОЛ печени, при этом отмечали снижение МДА ткани печени. Было найдено, что неостигмин на фоне метацина (0,1 мг/кг и 1 мг/кг) приводил к росту ГП ОЛ и МДА ткани печени, но отмечали снижение содержания ДК ОЛ печени.

Результатом проведенного окисления липидов микросом печени *in vitro* и присутствия комбинации фармакологических агентов неостигмин + метацин было сделано заключение о том, что изменения содержания продуктов ПОЛ печени, полученных *in vivo*, не объясняются влиянием только химических элементов применяемой комбинации фармакологических агентов неостигмина и метацина. Несовпадение результатов окисления липидов печени, проведенное *in vivo* и *in vitro* в присутствии неостигмина и метацина послужило основой для применения метода реципрокности.

Результатом введения животным неостигмина на фоне предварительного введения метацина (0,1 мг/кг и 1 мг/кг) и отдельного введения гексаметония (0,2 мг/кг) было отмечено проявление факта реципрокности при оценке содержания ДК ОЛ печени. Реципрокность проявлялась и при определении ГП ОЛ печени на фоне введения животным комбинации фармакологических агентов неостигмина и метацина, с отдельным введением животным гексаметония (0,2 мг/кг и 2 мг/кг). Но реципрокность не была отмечена при определении МДА ткани печени – неостигмин на фоне метацина повышал, а доза гексаметония 0,2 мг/кг, отдельно вводимая, недостоверно снижала, а в дозе 2 мг/кг – даже повышала содержание МДА ткани печени.

Как и в случае с mAChRs плазматической мембраны гепатоцитов, для создания полного представления о способности nAChRs плазматической мембраны гепатоцитов влиять на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ, влиять на изменения условий, способствующих росту ПОЛ печени периода холодных нагрузок, потребовалось введение фармакологических агентов, взаимодействующих непосредственно, прямо с nAChRs плазматической мембраны гепатоцитов и имеющих отличительную химическую структуру от ранее вводимых фармакологических аген-

тов. Это достигалось введением доз никотина 0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг и 5 мг/кг, а эффект блокады периферических nAChRs достигался введением гексаметония в дозах 0,2 мг/кг; 2 мг/кг и 20 мг/кг.

Результатом экспериментов введения животным никотина и гексаметония на фоне 5 дней холода были получены данные, свидетельствующие, что никотин увеличивал содержание продуктов ПОЛ печени – ДК ОЛ, ДК фракции СЖК печени, увеличивал содержание и МДА, определяемого в гомогенате печени. Важно отметить, что никотин *in vivo* увеличивал содержание и субстратных составляющих ПОЛ печени – увеличивал МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахидонової, МЭЖК Эйкоза ОЛ и фракции СЖК печени, при этом никотин увеличивал выраженность ТФК гомогената печени как на 30-ой, так и к 3-ей минуте экспериментов. Никотин вызывал изменения и в условиях, способствующих развитию ПОЛ печени, увеличивал содержание *trans*-изомеров ЖК (на примере ЖК Δ<sup>9</sup>,12 C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой) ОЛ и *trans*-изомеров фракции СЖК печени, увеличивал способность гомогената печени продуцировать АФК и содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови. Окисление липидов микросом печени в присутствии никотина показало, что индуцирование ферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* уменьшало окисление липидов, индуцирование же неферментативных механизмов ПОЛ в присутствии никотина вызывало противоположный эффект – отмечали увеличение окисления липидов микросом печени.

Введение животным гексаметония (0,2 мг/кг) на фоне 5 дней холодовой нагрузки уменьшало содержание продуктов ПОЛ печени: уменьшалось содержание ДК ОЛ печени, уменьшалась выраженность МДА ткани печени. Гексаметоний уменьшал содержание и субстратного обеспечения ПОЛ печени – МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахидонової, МЭЖК Эйкоза ОЛ и МЭЖК DGLA фракции СЖК печени, а в дозах 0,2 мг/кг и 20 мг/кг – уменьшал выраженность МЭЖК Арахидонової и МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени. Гексаметоний уменьшал содержание и ТФК гомогената печени на 30-ой минуте экспериментов и в дозе 20 мг/кг – к 3-ей минуте. Введение животным гексаметония влияло и на изменение условий, способствующих росту ПОЛ печени, при этом отмечали уменьшение содержания *trans*-изомеров ЖК ОЛ и фракции СЖК печени; снижалась способность гомогената печени продуцировать АФК и уменьшалось содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови. Окисление липидов микросом печени *in vitro* в присутствии гексаметония показало, что активация ферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* приводила к усилению окисления липидов микросом печени, активация же неферментативных механизмов и присутствии гексаметония приводило к противоположному эффекту – к ослаблению окисления липидов микросом печени.

В эффектах, полученных *in vivo* с участием никотина и гексаметония отмечали эффект реципрокности, но присутствовало совпадение направление окисления липидов печени, полученных *in vivo*, и окисление липидов микросом печени, полученных *in vitro*.

Суммируя данные по nAChRs, можно сделать общий вывод: возбуждение периферических nAChRs через эндогенный АХ либо введение прямого Н-холиномиметика никотина увеличивает, а введение Н-холиноблокатора гексаметония уменьшает выраженность продуктов ПОЛ, уменьшает содержание субстратных составляющих ПОЛ печени и влияет на выраженность условий, способствующих развитию ПОЛ печени периода холодových нагрузок, что, безусловно, приводит к изменению напряжения в работе клеточных мембран гепатоцитов и что послужит основой для проведения дальнейшей работы в выяснении интимных механизмов регуляции ПОЛ через холинорецепторный аппарат плазматической мембраны гепатоцитов и, вероятно, приведёт к выяснению способности периферических nAChRs к работе и в других органах в изменении содержания продуктов ПОЛ.

Таким образом, установление закономерностей влияния возбуждения периферических mAChRs и nAChRs через эндогенный АХ, установление закономерностей одновременного возбуждения mAChRs и nAChRs через АХ, вводимый в ткань печени *in situ*, установление закономерностей, возникающих при влиянии на выраженность продуктов ПОЛ печени, субстратных составляющих ПОЛ печени и влиянии на условия, способствующие развитию ПОЛ печени периода холодových нагрузок введением прямых М,Н-холиномиметиков и М,Н-холиноблокаторов, возможно, может послужить предпосылкой для создания нового класса соединений, влияющих на холинергическое звено и создающих условия для формирования ПОЛ на фоне холодových нагрузок.

Ускорение или замедление процессов ПОЛ в организме, потенцирование или предотвращение результатов окислительного стресса имеет немаловажное значение и для предотвращения основ патологических процессов, преждевременного износа и раннего старения биологической системы, при условии участия в данном процессе mAChRs и nAChRs. К тому же практическая медицина использует лекарственные средства, обладающие периферическим М,Н-холиномиметическими и М,Н-холинолитическими свойствами, что, по всей видимости, будет предотвращать или ускорять течение ПОЛ печени.

## Глава 6

# РЕЦИПРОКНОСТЬ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МЕЖДУ MACHRS И NACHRS КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ПОЛ ЧЕРЕЗ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

В настоящей работе изучали влияние непрямого М,Н-холиномиметика неостигмина, накапливающего блокадой антихолинэстеразных механизмов эндогенный АХ ткани печени; изучали эффект АХ ткани печени, вводимого *in situ*; изучали влияние непрямого, периферического М,Н-холиномиметика неостигмина, вводимого на фоне Н- и М-холиноблокаторов гексаметония и метацина; оценивали влияние прямых М- и Н-холиномиметиков (пилокарпин, никотин), М- и Н-холиноблокаторов (атропин и гексаметоний) на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ и изучали влияние условий, способствующих развитию ПОЛ печени после 3 ч и 5 дней охлаждения животных.

Данные *in vivo* сопоставляли с результатами ПОЛ печени, полученными *in vitro* при индуцировании ПОЛ микросом печени неферментативными и ферментативными механизмами в присутствии неостигмина, пилокарпина, гексаметония, метацина и атропина.

Для решения поставленных задач животных охлаждали на протяжении 3 ч и 5 дней (по 3 ч в день) при температуре  $-12^{\circ}\text{C}$ . На этом фоне применяли фармакологические агенты, влияющие на холинергические структуры плазматической мембраны гепатоцитов.

Изучение влияния холинергических механизмов на биологическую систему позволяло и ранее получать весьма ценные результаты. Так, результатом проведенных исследований, связанных с блокадой центральных холинергических структур центральной нервной системы, явилось использование центральных холиноблокаторов в фармакотерапии нейрогенных дистрофий [5], при нарушениях двигательной активности [43].

Результатами исследований лаборатории Н.А. Лосева получены данные, свидетельствующие о том, что ингибиторы АСhE с комбинацией с центральными и периферическими М- и Н-холиноблокаторами можно использовать для лечения повреждений центрального и периферического отделов нервной системы травматического характера; при детских церебральных параличах с синдромом выпадения двигательных функций [72; 136]; при лечении полной или частичной атрофии зрительных нервов и там, где, наря-

ду с традиционными методами лечения, применяют предварительную блокаду периферических mAChRs и производят одновременную стимуляцию nAChRs эндогенным АХ, а предварительную блокаду nAChRs сочетают со стимуляцией mAChRs эндогенным АХ [70; 72; 110]. В лечении обострений и профилактики рецидивов язвенной болезни медиогастральной и пилородуоденальной локализации язв желудка используют предварительное введение М-холиноблокатора метацина с последующим введением ингибитора АСhE неостигмина [20; 72].

Фармакологические подходы, используемые клинической практикой, и применение агентов, влияющих на холинергические белки плазматических мембран, предопределило применение данных методов и в нашей работе при решении поставленных задач. Тем более, что результаты, полученные ранее П.П. Денисенко [39; 40; 42] и В.Н. Гуриным [30; 31], свидетельствуют о работе холинергических структур, мобилизующих энергетические ресурсы организма при экстремальных условиях (рис. 22).

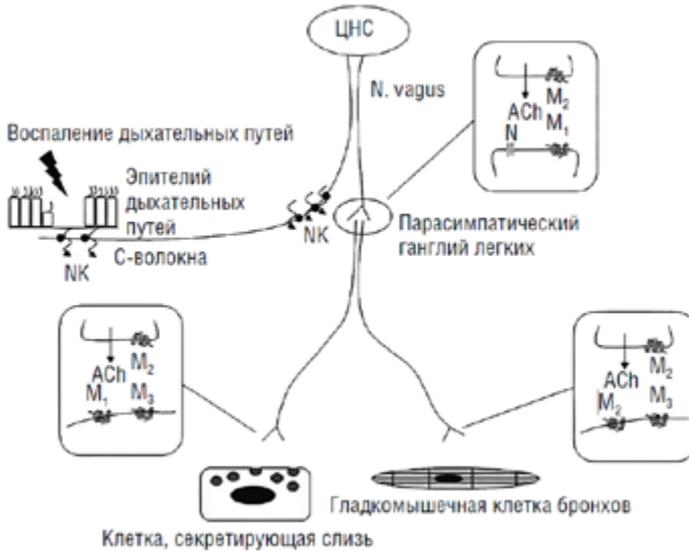


Рис. 22. Схема, иллюстрирующая вовлечение М-холинорецепторов в регуляцию разных физиологических функций

Наблюдениями ряда исследователей [81; 82; 83; 85; 86] показано, что основным вопросом стрессорного воздействия, и в том числе холода, является энергообеспечение, протекающее с участием PUFAs [51; 115; 345], ТФК [87], что нами представляется как ключевые составляющие формирования ПОЛ [406]. Реализация программы обеспечения организма субстратами ПОЛ (PUFAs, ТФК) периода холодных нагрузок осуществляется и с участием стресс-систем, активирующихся не только через гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую, но и симпатoadреналовую системы (рис. 23).

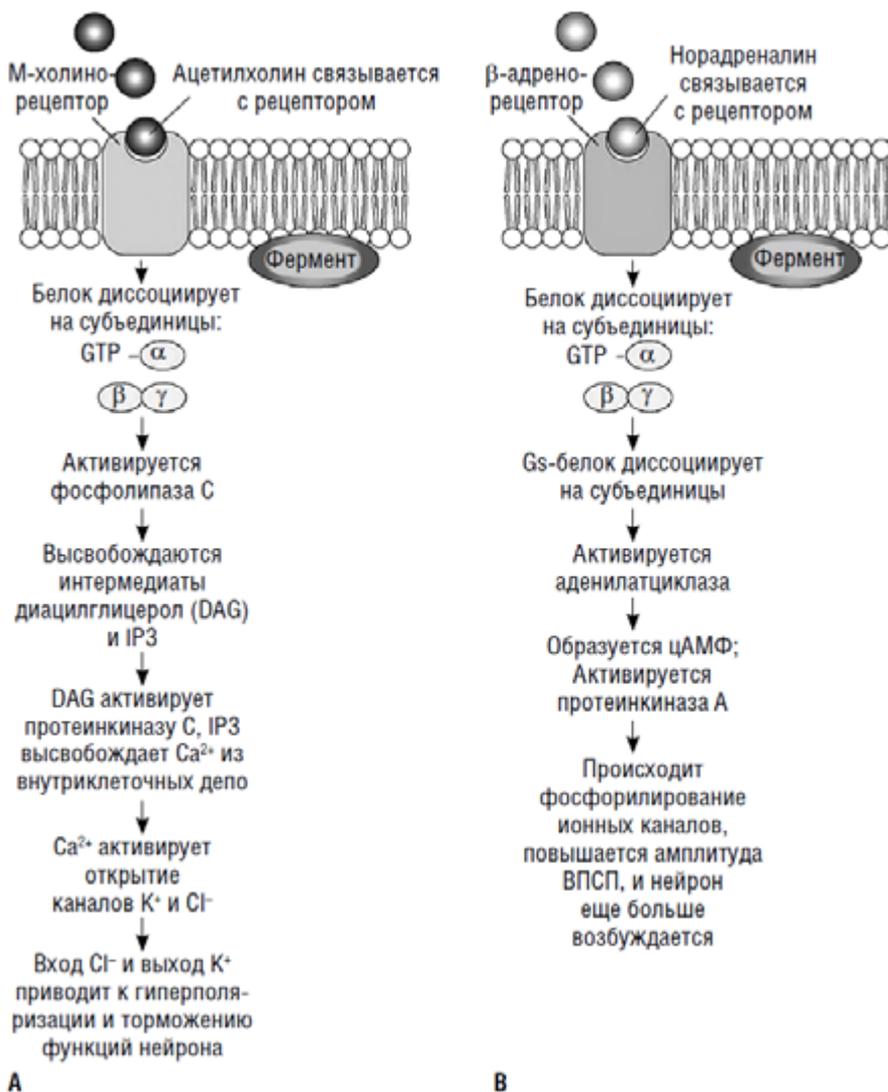


Рис. 23. Внутриклеточные процессы, сопряженные с активацией холинорецепторов (слева) и адренорецепторов (справа)

Принято считать, что активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы отражает избыточное поступление глюкокортикоидов, активация симпатoadrenalовой отдела вегетативной нервной системы – катехоламинов [29; 33; 78; 94; 95; 105; 106]. Принято также считать, что катехоламинами активируют не только глицерофосфолипазы мембран клетки – фосфолипазы семейства A<sub>2</sub> [257; 295; 340; 400], но активируют и другие виды фосфолипаз семейства C и D [92; 356]. Так, данными литературы отмечено влияние хо-

линергического звена на активность глицерофосфолипаз семейства C [417]. Катехоламины через аденилатциклазные механизмы клеточной мембраны, через активацию липолитических механизмов жирового депо тканей, через активацию тканевых липаз приводят к появлению свободных триглицеридов, что приводит к появлению неэстерифицированных (свободных) ЖК тканей, крови [52; 115].

Присутствие неэстерифицированных PUFAs тканей усиливает разобщение окисления и фосфорилирования [114], при этом отмечается увеличение содержания продуктов ПОЛ – гидроперекисей липидов [65; 66; 406], МДА тканей [85; 86]. Присутствием PUFAs тканей создаются условия для активации ферментативного синтеза оксипинов, где PUFAs, совместно с ТФК и ферментативными комплексами оксигеназ (LOX, COX, цитохром P-450) формируют оксипины *de novo* [22; 451; 466; 507; 477]. Весь этот окислительный субстратный комплекс способствует появлению новых окислительных структур в фосфолипидах клеточных мембран – OxPLs [226; 484].

Усиление окисления ненасыщенных компонентов фосфолипидов ассоциируется и с изменением мембранной подвижности белковых структур, включённых в мембраны клеток [174], при этом отмечается изменение температуры фазового перехода липидов клеточных мембран периода холодových нагрузок [62; 63], а также увеличение ПОЛ. Все эти изменения сопровождаются возникновением энергетического дефицита на уровне мембран клеток [105], что сопровождается усилением напряжения управления адаптационной деятельностью организма [51] и что, в свою очередь, создаёт предпосылки для формирования «структурного» следа холодových нагрузок тканей [10; 80; 82; 99].

По результатам наших опытов, содержание животных периода 3 ч и 5 дней холодной нагрузки, по 3 ч и температуре -12°C климатокамеры, приводило к изменению активности симпатoadреналовой системы.

Так, 3-часовая холодová нагрузка животных снижала содержание адреналина, но увеличивала выраженность НА ткани печени. Подобные результаты, нами были получены и на протяжении 5 дней охлаждения животных. Безусловно, изменение содержания НА ткани печени, рассматриваемого как медиатора, маркера активности симпатического отдела вегетативной нервной системы [73], приводит к росту липолитических процессов триглицеридов тканей, возможно, за счёт изменения активности глицерофосфолипаз [383]. Поскольку субстратным обеспечением работы фосфолипаз семейства A<sub>2</sub> является преимущественно ЖК Арахиса, то результатом уменьшения содержания МЭЖК Арахиса, фракции СЖК печени на фоне 3-часовой холодной нагрузки является, предположительно, изменение активности и глицерофосфолипаз семейства A<sub>2</sub> [205; 305; 327].

Необходимо, на наш взгляд, отметить проявление такого факта, что 5-дневная холодová нагрузка изменяла содержание всех МЭЖК семейства C20 фракции СЖК печени – МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахиса и МЭЖК Эйкоза,

что, на наш взгляд, является результатом активации, возможно, и других видов глицерофосфолипаз – С и D [305; 327]. Важно подчеркнуть, что отмечается увеличение содержания МЭЖК Эйкоза после 3 ч и 5 дней холода не только в ОЛ печени, но и во фракции СЖК.

Поскольку медиаторным субстратом деятельности холинергических механизмов биологической системы является АХ, то на первом этапе нашей работы был определён эффект фармакологического агента, накапливающего эндогенный АХ в ткани печени блокадой антихолинэстеразных механизмов, способного влиять на содержание как субстратных составляющих ПОЛ, так и продуктов ПОЛ печени. Так, внутривентральное введение животным неостигмина на фоне 3-часовой холодовой нагрузки приводило к изменениям содержания адреналина и НА ткани печени. По своему направлению эти изменения не совпадали с эффектами холодовой нагрузки. В частности, если снижение содержания адреналина ткани печени и действия холода объясняется повышением потребления адреналина тканью с увеличением содержания аденилатциклазы плазматических мембран клеток [94; 95; 96], то неостигмин, накапливающий антихолинэстеразными механизмами эндогенный АХ тканью, согласно теории J.H. Burn и M. Rand [190; 191], способен реализовать свой эффект через nAChRs хромаффинной ткани надпочечников, что, возможно, влияет не только на выброс, но и на потребление адреналина тканью печени.

Повышение содержания НА трактовалось нами, как количественное повышение одного из медиаторов симпатической нервной системы, необходимого для реализации стресс-реакции. Изменение содержания НА реализуется через аденилатциклазный механизм, через механизм кальмодулин-протеинкиназы, и при этом НА увеличивает активность, по всей видимости, и липаз триглицеридов жирового депо, и мембранных фосфолипаз. Поэтому данное явление приводит к запуску цепи приспособительных механизмов, активирующих ПОЛ [105], что, на наш взгляд, позволяет подвергаться разрушающему действию холода клеточным мембранам и, что, по всей видимости, связано с потерей плазматическими мембранами клеток возможности сохранять энергетический баланс [105].

Снижение содержания НА после введения неостигмина на фоне холода предположительно связано с проявлением гипертонуса М-холинергических механизмов клетки, приводящих к уменьшению высвобождения катехоламинов, что приводит к снижению и функции симпатического отдела вегетативной нервной системы на периферии [72].

В вопросе влияния неостигмина на содержание медиаторов симпатической нервной системы периода холодовых нагрузок затрагивался и вопрос о способности непрямого, периферического М,Н-холиномиметика неостигмина влиять на изменение числа двойных связей ОЛ и фракции СЖК печени. Оценивая изменение йодного числа ОЛ, фракции СЖК печени, мы трактовали данный показатель как определение потенциальной способно-

сти ненасыщенных компонентов липидов печени принимать участие в формировании ПОЛ.

Данный показатель иллюстрирует не только круг интересующих нас ненасыщенных алифатических углеводов – ЖК, но и другие классы ненасыщенных липидов: сквалена, полициклических ненасыщенных спиртов – стеринов (холестерин, стероидные гормоны) [49]. Поэтому изменение йодного числа ОЛ и фракции СЖК печени представляло для нас несомненный интерес как определение способности ненасыщенных компонентов липидов участвовать в формировании ПОЛ как возможного влияния фармакологических веществ холинергической направленности на индуцирование ПОЛ в перечисленных классах липидов.

Безусловно, увеличение йодного числа ОЛ и фракции СЖК печени периода 3-часовой холодовой нагрузки свидетельствовало о потенциальном увеличении числа двойных связей, что, по нашему мнению, увеличивает вероятность участия ненасыщенных компонентов липидов в ПОЛ печени, а введение неостигмина оценивалось нами как способность накопленного эндогенного АХ ускорять формирование ПОЛ, интенсифицировать переход между этапами окисления липидов [124] и поэтому расходование объёма двойных связей, регулирующих окислительные процессы в липидах, и предопределяет уменьшение пула двойных связей ОЛ, фракции СЖК печени при накоплении эндогенного АХ тканей.

Формирование теплового баланса биологической системы в условиях холода и напряжения периферических стресс-систем определяет поступление в кровь из жирового депо, из мембранного депо клеточных мембран липидного материала, с обязательным присутствием неэстерифицированных и эстерифицированных (в составе триглицеридов и глицерофосфолипидов крови) ЖК [229]. PUFAs, как неэстерифицированные (прерогатива активации цитозольных фосфолипаз  $A_2$ ), [205; 257; 419; 450], так и эстерифицированные (в соединении с глицерофосфолипидами мембран клетки) принимают энергетически удобную форму в своих дальнейших окислительных преобразованиях. Так появляются ненасыщенные липиды, не только с изменённым числом двойных связей [119], что приводит к изменениям физических свойств ненасыщенных липидов (изменение температуры фазового перехода ЖК) [62; 63], но отмечаются и количественные изменения содержания trans-изомеров ЖК [22; 69].

В наших экспериментах на примере ЖК  $\Delta^9,12$  C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой было показано, что 3-часовая холодовая нагрузка приводила к увеличению содержания trans-изомеров ЖК ОЛ печени, и введение животным неостигмина на фоне 3 ч холода увеличивало в большей степени содержание trans-изомеров ЖК ОЛ печени.

Данный экспериментальный факт подтверждает ранее высказанное нами предположение о возможном ускорении ПОЛ печени при увеличении содержания эндогенного АХ ткани печени. Так, наряду с изменением чис-

ла двойных связей ОЛ и фракции СЖК печени, на примере ЖК Δ<sup>9</sup>,12 C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой, отмечали рост числа trans-изомеров ЖК [119]. В подтверждение высказанного предположения нами приведены результаты экспериментов, свидетельствующие, что накопление эндогенного АХ тканью печени неостигмином на фоне 3 ч холода приводило к более выраженному увеличению содержания и субстратного обеспечения ПОЛ – МЭЖК Арахиса, МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени. Следует обратить внимание на факт, что МЭЖК Эйкоза и МЭЖК Арахиса фракции СЖК печени – это неэстерифицированные ЖК, и здесь возможна связь холинергических механизмов клетки с формированием простагландинов и простаноидов в период холодных нагрузок.

Содержание молекулярного кислорода тканей, на наш взгляд, является одним из определяющих элементов формирования ПОЛ печени [24; 49]. Поэтому наряду с изменениями в содержании ТФК ткани печени, способности гомогената печени продуцировать АФК, содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови при введении животным неостигмина на фоне 3 ч холодной нагрузки мы обратили внимание на способность гомогената печени продуцировать АФК. Возможно, что увеличение способности гомогената печени после холодных нагрузок продуцировать АФК – это результат гипоксического состояния ткани печени. У животных, подвергавшихся холодной нагрузке, проявляется дефицит энергетических ресурсов и, как следствие этого, недостаток синтеза АТФ с дальнейшим возникновением состояния гипоксии тканей [1]. Это, по всей видимости, усиливает формирование ПОЛ печени в большей степени. Возможно, что изменение способности гомогената печени продуцировать АФК у животных на фоне холодной нагрузки – результат стрессорной реакции биологической системы, который подтверждается изменением содержания катехоламинов ткани печени. Считают, что присутствие катехоламинов крови, превышающее в 5–10 раз показания контрольных групп животных, оказывает влияние на формирование ПОЛ тканей [10]. Полученные результаты свидетельствуют, что накопление эндогенного АХ, вызванного неостигмином на фоне 3 ч холодной нагрузки, способствует продуцированию АФК тканью печени в большей степени, что подтверждает наше предположение о возможном влиянии АХ на формирование ПОЛ печени.

Но были получены и факты, свидетельствующие, что неостигмин при 3-часовом холоде уменьшает содержание ТФК ткани печени. Предполагаем, что это явление возникает вследствие бронхоспастического синдрома, возникающего как результат доминирования М-холиномиметических эффектов гладкой мускулатуры бронхов [2]. И в конечном итоге – углубляется гипоксия ткани печени, и, возможно, потенцируется ускорение формирования ПОЛ печени.

Введение животным неостигмина на фоне 3 ч холода сопровождалось уменьшением содержания 2,3-ДФГ эритроцитов крови, что, по нашему мнению, приводило к уменьшению поступления молекулярного кислорода

в ткань печени и, что, по всей видимости, углубляет состояние гипоксии ткани печени периода холодовых нагрузок [6].

Оценивая содержание продуктов ПОЛ печени (ДК ОЛ, ГП ОЛ печени, МДА ткани печени), связанное с введением животным неостигмина периода 3-часовой холодовой нагрузки, нами высказывалось мнение о том, что эндогенный АХ ткани печени, накопленный неостигмином, ускоряет формирование процесса ПОЛ печени и ускоряет формирование продуктов ПОЛ [124]. Это предположение основывалось на данных экспериментов, свидетельствующих, что если 3-часовой холод вызывал увеличение содержания только ДК ОЛ печени при снижении ГП ОЛ и МДА гомогената печени, то введение неостигмина на фоне данного режима охлаждения животных приводило к росту содержания МДА, но при снижении ДК ОЛ и ГП ОЛ печени.

На наш взгляд необходимо отметить при этом изменения и в содержании  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени – неостигмин вызывал уменьшение  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени. Возможно существование связи между изменением пула  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени, уменьшением пула ГП ОЛ и ростом содержания МДА ткани печени на фоне введения животным неостигмина. Предполагаем это возможным за счёт изменения донатирования водородного потенциала от  $\alpha$ -токоферола к формирующемуся ПР ЖК и последующему образованию ГП ЖК с дальнейшей трансформацией ГП ЖК в альдегидный продукт ПОЛ – МДА, что мы и определяли при оценке содержания МДА ткани печени.

Одной из предлагаемых версий, объясняющих изменения содержания продуктов ПОЛ в присутствии неостигмина, послужило мнение, что химические элементы структур фармакологических агентов могут выступать в роли донора или акцептора редуцирующих эквивалентов редокс-цепей ткани печени и тем самым способны индуцировать переменную валентность в структуре неостигмина, оказывая влияние на формирование ПОЛ печени [89].

Так как молекула неостигмина содержит диметилкарбомоильную, оксифенольную и триметиламмонийную составляющие [79], и каждая из этих структур неостигмина способна к индуцированию ПОЛ [123], то предлагаемая версия, объясняющая изменение содержания продуктов ПОЛ, заставила нас провести ряд экспериментов, индуцирующих ПОЛ печени *in vitro*, в присутствии неостигмина при активации неферментативных механизмов. Результаты опытов показали, что усиления окисления липидов печени неферментативными механизмами в присутствии неостигмина не отмечается [123]. При активации же ферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* было отмечено увеличение СРО липидов печени. Таким образом, если присутствие химических элементов, формирующих диметилкарбомоильную, оксифенольную и триметиламмонийную составляющие молекулы неостигмина, не способствует активации ПОЛ печени, то тогда в ферментных окислительных механизмах клетки, при которых также индуцируется ПОЛ, должен участвовать и АХ [121]. Присутствие АХ ткани печени, безусловно, предполагает контакт АХ с холинорецепторным аппаратом плазматической мембраны клеток [48; 139],

поэтому выяснению вопросов влияния АХ на содержание продуктов ПОЛ, на содержание субстратных составляющих ПОЛ печени и был посвящён раздел работы, связанный с введением АХ в ткань печени.

При обобщении полученных результатов было сделано предположение, что АХ, накопленный тканью печени, и АХ ткани печени, введённый *in situ*, ускоряет окислительную трансформацию продуктов ПОЛ печени. При этом АХ влиял на выраженность и субстратных составляющих ПОЛ. Было отмечено, что с уменьшением мольной концентрации АХ, проходящего по сосудистому руслу ткани печени животных, меняется содержание МЭЖК Арахидной и МЭЖК Эйкоза ОЛ печени. Отмечается уменьшение содержания и  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени.

Результатом сопоставления данных по содержанию продуктов окисления липидов, полученных введением АХ в ткань печени, и результатов индуцированного ПОЛ печени *in vitro* в присутствии АХ явилось высказывание рабочей гипотезы о участии холинергических механизмов плазматической мембраны печени в формировании ПОЛ печени периода холодových нагрузок [123; 124].

Понимая, что мускарино- и никотиночувствительные холинергические структуры плазматической мембраны гепатоцитов отличаются не только своим строением [106; 176], но и функциями в клетке [302], было принято решение о проведении экспериментов с отдельным влиянием эндогенного АХ на mAChRs и nAChRs плазматической мембраны гепатоцитов с оценкой содержания продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ и оценкой условий, влияющих на формирование ПОЛ печени в период охлаждения животных. Нами был применён метод экспериментальной фармакологии в виде активации (возбуждения) отдельно mAChRs метабототропных G-белков плазматических мембран клеток и отдельно nAChRs лиганд-проводящих ионных каналов плазматической мембраны гепатоцитов эндогенным АХ [72]. При этом применяли непрямой М,Н-холиномиметик на фоне предварительного введения, в случае возбуждения mAChRs, Н-холиноблокатора (гексаметоний), а в случае возбуждения nAChRs – М-холиноблокатора (метацин) [72; 73]. Для возбуждения периферических mAChRs плазматической мембраны гепатоцитов эндогенным АХ требовалось перед введением неостигмина введение животным Н-холинолитика. Нами был предложен гексаметоний.

Сопоставляя данные по влиянию Н-холиноблокатора гексаметония на содержание продуктов ПОЛ печени периода холодной нагрузки и полученных *in vivo* с данными влияния гексаметония на ПОЛ микросом печени *in vitro* (при индуцировании ПОЛ ферментативными механизмами), пришли к выводу, что изменения содержания ДК ОЛ, ГП ОЛ печени и МДА гомогената печени не объясняются химическими элементами структуры гексаметония и, вероятней всего, эти изменения при оценке содержания продуктов ПОЛ печени – результат взаимодействия гексаметония с белковыми холи-

ноцептивными структурами плазматической мембраны гепатоцитов [129; 131]. Поэтому в качестве Н-холинолитика перед введением фармакологического агента неостигмина нами и был предложен гексаметоний.

Результаты ПОЛ печени, полученные после 3-часовой холодной нагрузки и введении животным неостигмина на фоне гексаметония, свидетельствовали о увеличении выраженности ДК ОЛ, ГП ОЛ печени при снижении содержания МДА ткани печени. Напомним, что введение животным неостигмина на фоне 3 ч холода приводило к росту содержания МДА на фоне снижения ДК ОЛ и ГП ОЛ печени. Сопоставление результатов экспериментов (введение неостигмина на фоне гексаметония и введение животным только неостигмина), свидетельствует, на наш взгляд, об изменении пула содержания продуктов ПОЛ печени.

Введение неостигмина на фоне предварительного введения животным метацина (напомним, что при такой комбинации фармакологических агентов мы добивались возбуждения nAChRs эндогенным АХ) приводило к следующим результатам: неостигмин на фоне метацина (0,01 мг/кг) вызывал рост содержания ДК ОЛ, ГП ОЛ печени и снижение содержания МДА; неостигмин на фоне метацина (0,1 мг/кг; 1 мг/кг) приводил к увеличению ГП ОЛ и МДА гомогената печени, но при снижении содержания ДК ОЛ печени.

Данные содержания ДК ОЛ, ГП ОЛ печени, МДА ткани печени и накопления эндогенного АЦХ, вызываемого неостигмином, показали факт ускорения формирования продуктов ПОЛ печени (напомним, что если 3-часовой холод вызывал увеличение ДК ОЛ на фоне снижения ГП ОЛ печени и МДА ткани печени, то введение неостигмина приводило к росту МДА, при этом отмечали снижение содержания ДК ОЛ и ГП ОЛ печени).

Складывалось впечатление, что одновременное возбуждение mAChRs и nAChRs плазматической мембраны гепатоцитов эндогенным АХ приводило к более ускоренному формированию продуктов ПОЛ печени, в отличие от введения неостигмина на фоне как гексаметония (возбуждение периферических mAChRs эндогенным АХ), так и метацина (возбуждение периферических nAChRs эндогенным АХ).

Сопоставляя результаты введения животным неостигмина на фоне как гексаметония, так и метацина с данными индуцирования ПОЛ микросом печени инкубационной среды (в присутствии неостигмина и гексаметония; в присутствии неостигмина и метацина), мы не смогли дать объяснение изменению окисления липидов микросом печени только химическими элементами, входящими в структурную комбинацию неостигмина с гексаметонием и неостигмина с метацином, в связи с чем и было высказано предположение, что ответ на этот вопрос даст применение метода реципрокности [72; 121; 126; 130]. Действие метацина инкубационной среды индуцированием ПОЛ микросом печени ферментативными механизмами (мольная концентрация метацина в инкубационной среде соответствовала дозам метацина вводимого животным – 0,1 мг/кг и 1 мг/кг) не убедило нас в способности

химических элементов, входящих в структуру метацина, влиять на формирование ПОЛ печени. Поэтому и был применён метод реципрокности, достигаемый введением отдельно метацина в дозах 0,1 мг/кг и 1 мг/кг.

Результаты введения животным неостигмина на фоне гексаметония и введения отдельно метацина свидетельствуют о проявлении феномена реципрокности при оценке содержания ДК ОЛ, ГП ОЛ печени. Реципрокность была отмечена и при оценке содержания МДА ткани печени, и отдельном введении животным метацина, но только в дозе 0,1 мг/кг. Следовательно, результаты экспериментов, определяющих содержание продуктов ПОЛ печени (ДК ОЛ, ГП ОЛ печени и МДА ткани печени), показывали проявление факта реципрокности. На основании этого факта высказывалось предположение о участии периферических mAChRs G-белков плазматической мембраны гепатоцитов в формировании ПОЛ печени периода 3-часовой холодовой нагрузки.

Оценивая результаты экспериментов, связанных с возбуждением периферических nAChRs эндогенным АХ, и отдельным введением животным периферического Н-холинолитика (гексаметоний), отмечали проявление реципрокности и при оценке содержания ДК ОЛ, ГП ОЛ печени. Но реципрокность при оценке содержания МДА ткани печени нами не была зарегистрирована.

Полученные результаты позволяют высказать предположение об участии периферических никотиночувствительных ацетилхолиновых участков лиганд-проводящих ионных каналов [210; 377] плазматической мембраны гепатоцитов в ПОЛ печени и трактовать полученные факты как подготовку к формированию ПОЛ печени.

Для полного представления способности периферических mAChRs и nAChRs плазматической мембраны гепатоцитов влиять на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ, влиять на изменение условий, способствующих формированию ПОЛ печени периода холодовых нагрузок потребовалось введение фармакологических агентов, взаимодействующих непосредственно, прямо с mAChRs и nAChRs плазматической мембраны гепатоцитов и имеющих несколько отличную химическую структуру от ранее вводимых комбинаций фармакологических агентов, возбуждающих отдельно mAChRs и возбуждающих отдельно nAChRs плазматической мембраны гепатоцитов эндогенным АХ [72; 73]. Так, возбуждение mAChRs достигалось введением пилокарпина, а эффект блокады вызывался атропином [38; 39; 116; 225]. В случае nAChRs гепатоцитов возбуждение вызывали введением животным никотина [70; 71; 72; 164], а эффект блокады nAChRs достигался введением гексаметония [146]. Поскольку mAChRs плазматической мембраны клеток принято считать ключевыми структурами, реализующими программу клеточной холинергии [42; 48], то дальнейший этап обсуждения материала, посвящённого изменению содержания продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени и полученных *in vivo* и *in vitro*, мы начали с пилокарпина и атропина (рис. 24).

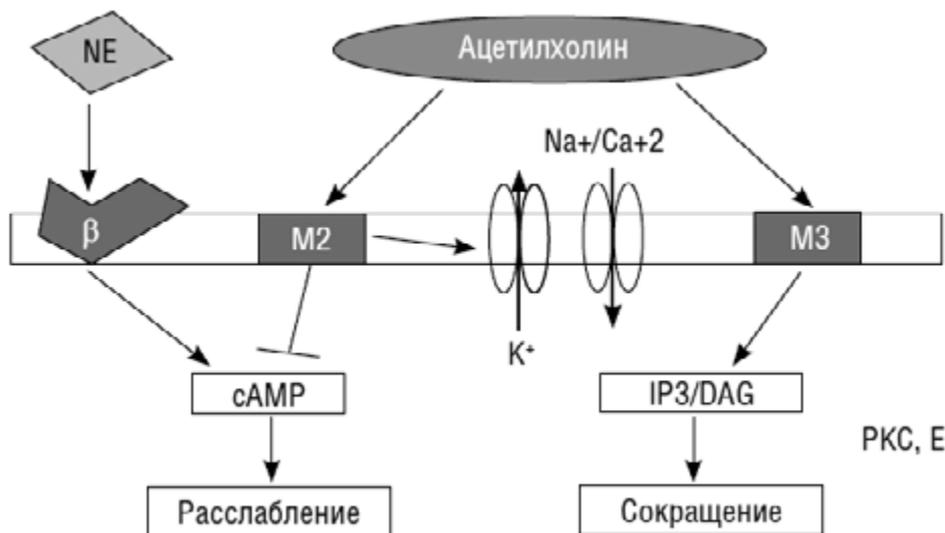


Рис. 24. Иллюстрация активации ацетилхолином М-холинорецепторов

При сопоставлении данных, полученных *in vivo* (введение животным пилокарпина и атропина на фоне 5-дневной голодовой нагрузки) с результатами ПОЛ, индуцированного *in vitro*, в присутствии пилокарпина и атропина, мы отмечали, что результаты *in vivo* и результаты индуцирования ПОЛ *in vitro* в присутствии пилокарпина и атропина противоположны по направлениям. Так, пилокарпин *in vivo* увеличивал выраженность ДК ОЛ печени, ДК ОЛ микросом печени, ДК фракции СЖК печени; увеличивал выраженность ГП фракции СЖК печени, ГП ОЛ микросом печени и увеличивал содержание МДА ткани печени, МДА водной фазы МЭРГ. Введение животным пилокарпина увеличивало содержание и субстратных составляющих ПОЛ: *trans*-изомеров ЖК (на примере ЖК C<sub>18:2</sub> Δ<sup>9,12</sup> линолевой, диеновой), МЭЖК Арахидной фракции СЖК; увеличивал выраженность ТФК гомогената печени, на 3-ей минуте эксперимента и увеличивал содержание α-токоферола ОЛ печени. В целом складывалось впечатление, что эффекты пилокарпина, полученные *in vivo*, совпадают по направленности с окислительными эффектами пилокарпина *in vitro*. Напомним, что пилокарпин *in vitro* способствовал увеличению окисления липидов микросом печени индуцированием неферментативных механизмов ПОЛ, и мы высказывали предположение, что присутствие пилокарпина ткани печени способно индуцировать ПОЛ. Введение же животным атропина на фоне 5 дней голодовой нагрузки вызывало противоположные пилокарпину эффекты (данные *in vivo*). Так, атропин у животных снижал выраженность ДК ОЛ печени до уровня группы контроль-2 (холод); снижал ДК ОЛ микросом печени и ДК фракции СЖК печени; снижал ГП фракции СЖК печени и ГП ОЛ микросом

печени; снижал содержание МДА ткани печени до уровня группы животных контроль-2 (холод) и снижал МДА водной фазы МЭРГ. Атропин уменьшал выраженность и в субстратных составляющих ПОЛ печени: содержание *trans*-изомеров ЖК (на примере ЖК  $\Delta^9,12$  C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой), содержание МЭЖК Арахиса, фракции СЖК; уменьшал содержание ТФК гомогената печени на 3-ей минуте экспериментов и уменьшал выраженность  $\alpha$ -токоферола ОЛ печени. Но важно отметить, что атропин в инкубационной среде при индуцировании неферментативных механизмов окисления липидов микросом печени вызывал усиление окисления липидов печени.

Подчёркиваем, что атропин *in vitro* мольной концентрации, соответствующей применяемым *in vivo* дозам атропина, способствовал росту ПОЛ микросом печени инкубационной среды.

Получение подобных результатов (пилокарпин *in vivo* вызывал увеличение содержания продуктов ПОЛ, увеличивал выраженность субстратных составляющих ПОЛ печени и *in vitro* пилокарпин увеличивал способность липидов микросом печени к окислению) предполагает влияние химических элементов структуры пилокарпина на ПОЛ печени. Но результаты экспериментов с атропином, полученные *in vivo* и *in vitro* не укладываются в логику общепринятых постулатов развития ПОЛ – атропин *in vivo* снижал выраженность продуктов ПОЛ и снижал выраженность субстратных составляющих ПОЛ, а *in vitro* атропин индуцированием неферментативных механизмов ПОЛ увеличивал окисление липидов микросом печени.

Предполагая, что при развитии ПОЛ печени в условиях холодной нагрузки доминируют механизмы неферментативного ПОЛ печени, объяснить возникшую разнонаправленность содержания продуктов ПОЛ и субстратных составляющих ПОЛ печени *in vivo* с окислением липидов, полученных *in vitro*, в присутствии пилокарпина и атропина только химическим строением фармакологических агентов не представляется возможным. Подобная разнонаправленность содержания продуктов ПОЛ, полученных *in vivo* и *in vitro* в присутствии пилокарпина и атропина, становится основой высказывания предположения о возможном участии метаболитотропных mAChRs G-белков плазматической мембраны гепатоцитов в формировании ПОЛ печени.

Сопоставляя результаты опытов введения животным пилокарпина и атропина с результатами экспериментов *in vitro* в присутствии пилокарпина и атропина с индуцированием ферментативных механизмов ПОЛ, также отмечается разнонаправленность результатов, получаемых как *in vitro*, так и *in vivo*. При индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* пилокарпин и атропин в инкубационной среде приводили к однонаправленному уменьшению окисления липидов микросом печени, и при соответствующих расчётах определяли даже уменьшение окислительного эффекта липидов печени. Но *in vivo* пилокарпин по-прежнему увеличивал выраженность продуктов ПОЛ: ДК ОЛ печени, ДК ОЛ микросом печени и ДК фракции СЖК

печени; ГП фракции СЖК печени и ГП ОЛ микросом печени; МДА ткани печени и МДА водной фазы МЭРГ. Пилокарпин увеличивал выраженность и субстратных составляющих ПОЛ печени: увеличивал содержание trans-изомеров ЖК (на примере ЖК Δ9,12 C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой), увеличивал содержание МЭЖК Арахис фракции СЖК; увеличивал выраженность ТФК гомогената печени на 3-ей минуте экспериментов и увеличивал содержание α-токоферола ОЛ печени. Объяснить подобную разнонаправленность при оценке содержания продуктов ПОЛ, полученных *in vivo*, с окислением липидов микросом печени в присутствии пилокарпина *in vitro* только химическими элементами структуры пилокарпина представляется также затруднительным. Атропин же *in vitro* уменьшал окисление липидов микросом печени и *in vivo* снижал выраженность продуктов ПОЛ печени. Поэтому сопоставление фактов *in vivo* и *in vitro* и индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ в присутствии атропина свидетельствуют больше о влиянии на ПОЛ печени химических элементов структуры атропина. Но, результаты экспериментов свидетельствуют и о другом – атропин *in vivo* вызывал увеличение содержания ГП ОЛ печени, увеличивал содержание и субстратных составляющих формирования ПОЛ печени (МЭЖК Арахис ОЛ печени, МЭЖК DGLA и МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени; отмечался рост содержания ТФК, к 30-ой минуте эксперимента). Атропин увеличивал выраженность и в условиях, способствующих росту ПОЛ печени: увеличивал содержание адреналина ткани печени; йодного числа ОЛ и фракции СЖК печени; содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови. Поэтому объяснить полученные факты влиянием только химических элементов структуры атропина на ПОЛ печени, на наш взгляд, также не представляется возможным.

Таким образом, суммируя результаты ПОЛ печени, индуцированного *in vivo* холодной нагрузкой и результаты ПОЛ, индуцированного *in vitro* в присутствии микросом печени, пилокарпина и атропина, следует отметить, что нельзя объяснить подобные изменения только влиянием химических элементов фармакологических агентов.

Как результат сопоставления изложенных фактов высказывается предположение о влиянии mAChRs метаботропных G-белков плазматической мембраны гепатоцитов на содержание продуктов ПОЛ и влияние mAChRs метаботропных G-белков плазматической мембраны гепатоцитов на выраженность субстратных составляющих ПОЛ печени. Подтверждением данного предположения может быть изложение фактов, свидетельствующих о проявлении реципрокности при оценке содержания продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени, при оценке условий, способствующих росту ПОЛ печени, и связанных с введением пилокарпина и атропина периода 5-дневного охлаждения животных. Так, реципрокность отмечали в определении содержания продуктов ПОЛ печени – ДК фракции СЖК печени; ГП ОЛ и ГП фракции СЖК печени; ДК ОЛ и ГП ОЛ МЭРГ; МДА водной фазы микросом печени.

Реципрокность также отмечали при оценке содержания *trans*-изомеров ЖК (на примере  $\Delta^9,12$  C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой); при оценке МЭЖК DGLA и МЭЖК Арахидной фракции СЖК печени; при оценке содержания ТФК гомогената печени как на 3-ей, так и к 30-ой минуте экспериментов. Реципрокность проявлялась и в оценке условий, способствующих росту ПОЛ печени: при оценке содержания адреналина ткани печени, при оценке йодного числа ОЛ и фракции СЖК печени, при оценке 2,3-ДФГ эритроцитов крови. На наш взгляд, реципрокность проявляется в условиях, способствующих развитию ПОЛ печени.

Таким образом, сопоставляя результаты введения животным неостигмина на фоне гексаметония и отдельного введения метацина периода 3-часовых холодовых нагрузок при оценке содержания продуктов ПОЛ печени; при оценке результатов содержания субстратных составляющих ПОЛ печени; при оценке результатов изменения условий, способствующих росту ПОЛ печени, и введении животным пилокарпина и атропина периода 5 дней охлаждения животных, можно отметить проявление реципрокности. Получение подобных выводов, на наш взгляд, является основой утверждения о влиянии периферических mAChRs метаботропных G-белков плазматической мембраны гепатоцитов на формирование процесса ПОЛ печени периода холодовых нагрузок.

Результаты возбуждения nAChRs гепатоцитов эндогенным АХ и результаты блокады nAChRs Н-холинолитиком при оценке содержания продуктов ПОЛ периода 3-часового охлаждения животных нами уже обсуждались, поэтому, доводя до логического завершения обсуждение результатов экспериментов возбуждения nAChRs плазматической мембраны гепатоцитов и их влияния на продукты ПОЛ, влияния на субстратное обеспечение ПОЛ печени, необходимо было закончить обсуждение и по влиянию прямого Н-холиномиметика (никотин) и Н-холинолитика (гексаметоний) на nAChRs гепатоцитов периода 5 дней охлаждения животных.

Данные по изменению содержания продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени, достигнутых введением никотина и гексаметония периода 5 дней холодовой нагрузки с результатами ПОЛ, индуцированного *in vitro* ферментативными и неферментативными механизмами, отмечали, что содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ *in vivo* и результаты ПОЛ *in vitro* в присутствии никотина и гексаметония так же, как и в случае с пилокарпином и атропином, противоположны по направленности. Так, никотин периода 5 дней охлаждения увеличивал содержание продуктов ПОЛ печени – ДК ОЛ и фракции СЖК печени, увеличивал содержание МДА ткани печени. Никотин *in vitro* при индуцировании ПОЛ ферментативными механизмами вызывал противоположный эффект – снижал окисление липидов микросом печени (напомним, что никотин *in vitro* уменьшал окисление липидов микросом печени, а тепловая инактивация белка липидов МЭРГ даже увеличивала антиокислительную активность

никотина). Важно отметить, что никотин *in vivo* на протяжении 5 дней охлаждения животных увеличивал содержание и субстратных составляющих ПОЛ печени – содержание *trans*-изомеров ЖК ОЛ и фракции СЖК печени (на примере ЖК Δ9,12 C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой); увеличивал выраженность МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахидоновой, МЭЖК Эйкоза ОЛ и фракции СЖК печени; увеличивал ТФК ткани печени, определяемой как на 30-ой, так и на 3-ей минуте экспериментов. Никотин на протяжении 5 дней охлаждения животных влиял и на условия, способствующие росту ПОЛ, – увеличивал способность гомогената печени продуцировать АФК и увеличивал содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови.

Фармакологический агент гексаметоний в инкубационной среде при индуцировании ферментативных механизмов ПОЛ вызывал усиление окисления липидов микросом печени, а введение животным гексаметония (0,2 мг/кг) на фоне 5 дней холодной нагрузки уменьшало содержание ДК ОЛ печени. В дозе 2 мг/кг гексаметоний уменьшал выраженность МДА ткани печени, выраженность составляющих субстратного обеспечения ПОЛ печени – содержание *trans*-изомеров ЖК ОЛ и фракции СЖК печени (на примере ЖК Δ9,12 C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой); уменьшал МЭЖК DGLA, МЭЖК Арахидоновой, МЭЖК Эйкоза ОЛ и МЭЖК DGLA фракции СЖК печени. Дозы гексаметония 0,2 мг/кг и 20 мг/кг снижали МЭЖК Арахидоновой и МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени, уменьшали содержание ТФК ткани печени на 30-ой минуте экспериментов и в дозе 20 мг/кг – на 3-ей минуте экспериментов. Гексаметоний снижал способность гомогената печени продуцировать АФК и уменьшал содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови.

Таким образом, сопоставлением фактов, что никотин *in vivo* периода 5 дней охлаждения вызывал увеличение содержания продуктов ПОЛ печени, а *in vitro* при активации ферментативных механизмов ПОЛ уменьшал способность липидов микросом печени к окислению; гексаметоний *in vitro* усиливал окисление липидов микросом печени, а *in vivo* уменьшал выраженность продуктов ПОЛ и субстратных составляющих ПОЛ печени, не может свидетельствовать в пользу участия только химических элементов структур никотина и гексаметония в процессе одноэлектронного окисления и восстановления липидов печени, оказывая влияние на результаты ПОЛ ткани печени. Следовательно, результаты сопоставления экспериментальных фактов по применению никотина и гексаметония требуют высказывания предположения об участии и никотиночувствительных лиганд-проводящих ацетилхолиновых участков ионных каналов плазматической мембраны гепатоцитов в ПОЛ печени.

Обсуждая влияние nAChRs на ПОЛ печени периода холодных нагрузок, можно сопоставить между собой и следующие данные. Так, если за основу возникновения ПОЛ печени брать механизм неферментативного индуцирования ПОЛ в присутствии никотина и гексаметония, то сопоставление экспериментального материала, полученного *in vivo* и *in vitro*, показывает, что

никотин индуцированием неферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* усиливал окисление липидов микросом печени, и результаты экспериментов, полученные *in vivo*, также свидетельствовали, что дозы никотина 0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг и 5 мг/кг увеличивали выраженность одного из продуктов ПОЛ печени – ДК ОЛ печени. Гексаметоний же индуцированием неферментативных механизмов ПОЛ *in vitro* уменьшал окисление липидов микросом печени, и в дозе 0,2 мг/кг *in vivo* также уменьшал содержание ДК ОЛ печени, но в дозах 2 мг/кг и 20 мг/кг гексаметоний *in vivo* увеличивал содержание ДК ОЛ печени.

Характеризуя окисление липидов печени, полученное *in vivo*, в присутствии никотина и гексаметония и сопоставляя с результатами неферментативных механизмов ПОЛ *in vitro*, можно также отметить следующее: *in vivo* и *in vitro* происходит совпадение эффектов окисления липидов в присутствии никотина и гексаметония по направленности. И в данном сопоставлении результатов окисления липидов печени можно предположить участие химических элементов структур никотина и гексаметония. Подтверждением данного предположения могут быть и результаты, полученные во фракции СЖК печени – никотин (0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг; 5 мг/кг) и гексаметоний (0,2 мг/кг; 2 мг/кг; 20 мг/кг) вызывали однонаправленные изменения при оценке содержания ДК – однонаправленно увеличивали содержание ДК фракции СЖК печени. Но, сопоставляя результаты экспериментов, полученные при определении ГП ОЛ и ГП фракции СЖК печени, с данными по окислению липидов микросом печени *in vitro* в присутствии никотина и гексаметония и индуцировании неферментативных механизмов ПОЛ, вновь отмечается проявление разнонаправленности по результатам окисления липидов печени: дозы никотина 0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг и 5 мг/кг *in vivo* снижали содержание ГП ОЛ и ГП фракции СЖК печени, а дозы гексаметония 0,2 мг/кг; 2 мг/кг и 20 мг/кг *in vivo* увеличивали выраженность ГП ОЛ и ГП фракции СЖК печени (напомним, *in vitro* при индуцировании неферментативных механизмов окисления липидов никотин увеличивал окисление липидов микросом печени, а гексаметоний *in vitro* при активации неферментативных механизмов уменьшал окисление липидов микросом печени). Поэтому сопоставление данных по содержанию ГП ОЛ и ГП фракции СЖК печени, полученных *in vivo*, с данными окисления липидов микросом печени *in vitro* в присутствии никотина и гексаметония, не свидетельствуют в пользу предположения об участии только химических элементов никотина и гексаметония в формировании продуктов ПОЛ печени – ГП ОЛ и ГП фракции СЖК.

Оценивая содержание МДА ткани печени, полученные *in vivo* при введении животным никотина и гексаметония, и сопоставляя с данными по окислению липидов микросом печени в присутствии никотина и гексаметония *in vitro*, можно отметить также несовпадение результатов окисления липидов, полученные как *in vivo*, так *in vitro* – никотин (0,05 мг/кг; 5 мг/кг) *in vivo*

увеличивал содержание МДА, а гексаметоний (0,2 мг/кг) *in vivo* снижал содержание МДА ткани печени. И при этом получены результаты, свидетельствующие о возникновении эффекта, трактуемого как реципрокность, – никотин (0,5 мг/кг) *in vivo* уменьшал содержание МДА, а гексаметоний (0,2 мг/кг и 20 мг/кг) *in vivo* увеличивал МДА ткани печени. Здесь результаты не совпадают с данными, полученными в присутствии никотина и гексаметония *in vitro*. Что касается сопоставления результатов влияния никотина и гексаметония на содержание ГП ОЛ МЭРГ, полученных *in vivo*, с данными окисления липидов микросом печени в присутствии никотина и гексаметония, то, как и в случае с МДА гомогената печени, отмечается несовпадение направлений по результатам окисления липидов. Так, никотин *in vivo* (0,05 мг/кг; 0,5 мг/кг; 5 мг/кг) снижал содержание ГП ОЛ МЭРГ, хотя *in vitro* в эквимольных концентрациях никотин усиливал окисление липидов микросом печени. Гексаметоний (20 мг/кг) *in vivo* повышал выраженность ГП ОЛ МЭРГ, а *in vitro* гексаметоний мольной концентрации, соответствующей введению животным данной дозы гексаметония, уменьшал окисление липидов микросом печени.

Таким образом, сопоставление результатов ПОЛ печени, полученных *in vivo* при холодной нагрузке, с ПОЛ микросом печени, индуцированного неферментативными и ферментативными механизмами *in vitro* в присутствии никотина и гексаметония, приводит к выводу, что увеличение и снижение содержания продуктов ПОЛ печени объяснить участием только химических элементов, входящих в структуры молекул никотина и гексаметония, не представляется возможным. Как одно из предположений, возникает мнение о возможном влиянии на изменение содержания продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени никотиночувствительных, лиганд-проводящих ацетилхолиновых участков ионных каналов плазматической мембраны гепатоцитов.

Таким образом, подводя итог результатам наших экспериментальных исследований, следует отметить, что введение фармакологических веществ, возбуждающих и блокирующих периферические холинергические структуры плазматической мембраны гепатоцитов, разнонаправленно влияют на содержание продуктов ПОЛ, субстратных составляющих процесса ПОЛ и на условия, способствующие изменению ПОЛ печени.

Сопоставление результатов, полученных *in vivo*, с данными, полученными в инкубационной среде и присутствии фармакологических агентов, возбуждающих либо блокирующих холинергические структуры гепатоцитов, дает основание считать, что холинергические механизмы участвуют в формировании процесса ПОЛ печени периода холодных нагрузок.

Необходимо при этом отметить, что возбуждение mAChRs эндогенным АХ и введение прямого М-холиномиметика (пилокарпин) усиливают выраженность продуктов ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ печени, уменьшают выраженность условий, способствующих росту ПОЛ печени, а

возбуждение периферических nAChRs эндогенным АХ и введение прямого Н-холиномиметика (никотин), нами трактуется, как подготовительный этап к формированию ПОЛ печени.

Подтверждением положения о том, что холинореактивные структуры плазматических мембран гепатоцитов принимают участие в ПОЛ печени периода холодových нагрузок служат данные опытов, связанные с введением М- и Н-холиноблокаторов (атропин и гексаметоний) – они совместно с М,Н-холиномиметиками демонстрируют проявление реципрокности.

На наш взгляд, свидетельством участия фармакологических агентов холинотропной направленности плазматической мембраны гепатоцитов в ПОЛ печени периода холодových нагрузок является и проявление феномена реципрокности по Н.А. Лосеву (реципрокность между mAChRs и nAChRs) [70; 72; 73; 75]. В наших исследованиях реципрокность между mAChRs и nAChRs проявлялась: в условиях, способствующих развитию ПОЛ печени; в субстратных составляющих ПОЛ печени и в изменении содержания продуктов ПОЛ печени. Так, например, в условиях, способствующих развитию ПОЛ печени, реципрокность определялась при определении адреналина ткани печени; при определении содержания 2,3-ДФГ эритроцитов крови – если никотин (0,5 мг/кг; 5 мг/кг) в случае определения адреналина ткани печени и никотин (0,5 мг/кг) в случае определения 2,3-ДФГ эритроцитов крови повышал выраженность перечисленных показателей, то пилокарпин (10 мг/кг) снижал их. В случае применения соответствующих М- и Н-холиноблокаторов – гексаметоний (0,2 мг/кг) при определении адреналина ткани печени и гексаметоний (0,2 мг/кг; 2 мг/кг; 20 мг/кг) при определении 2,3-ДФГ эритроцитов крови снижал, то атропин (1 мг/кг) увеличивал выраженность упомянутых условий, способствующих развитию ПОЛ печени.

Реципрокность (по Н.А. Лосеву) определялась и в субстратных составляющих ПОЛ печени при определении МЭЖК фракции СЖК печени:  $\Delta 11,14,17$  C20:3 эйкозотриеновой (digomo- $\gamma$ -linolenic acid, МЭЖК DGLA);  $\Delta 5,8,11,14$  C20: 4 эйкозатетраеновой (МЭЖК Арахис);  $\Delta 5,8,11,14,17$  C<sub>20:5</sub> эйкозапентаеновой (МЭЖК Эйкоза), а также при оценке содержания ТФК гомогената печени. Реципрокность также определялась и в продуктах ПОЛ печени – ДК ОЛ печени; ГП фракции СЖК печени; МДА ткани печени; ГП ОЛ МЭРГ. В контексте изложения данных о реципрокности между mAChRs и nAChRs [75] (реципрокность по Н.А. Лосеву) уместно ещё раз сделать акцент на фактах проявления однонаправленности или синергизма при сопоставлении данных по применению М-холиномиметика (пилокарпин) и Н-холиноблокатора (гексаметоний), Н-холиномиметика (никотин) и М-холинолитика (атропин) при определении условий, обеспечивающих развитие ПОЛ печени, при определении субстратных составляющих и при определении изменений содержания продуктов ПОЛ печени периода 5 дней холодových нагрузок.

Таким образом, все полученные экспериментально факты свидетельствуют в пользу выдвигаемого положения о работе как отдельного, так и комбинационного применения фармакологических агентов холинотропной направленности (неостигмин, ацетилхолин, гексаметоний, метацин, пилокарпин, атропин, никотин) с холиноцептивными белками плазматической мембраны гепатоцитов в ПОЛ печени периода холодových нагрузок.

Полученные результаты открывают возможность использования не только фармакологических средств, влияющих на периферические mAChRs и nAChRs плазматических мембран гепатоцитов с целью ослабления или усиления формирования продуктов ПОЛ, ослабления или усиления влияния на субстратные составляющие ПОЛ печени, с целью изменения условий, способствующих росту ПОЛ печени периода действия холода, но и новые возможности определения работы и существования рецепторных белков плазматических мембран гепатоцитов в условиях активации ПОЛ, индуцированного холодowymi нагрузками. К тому же данную работу можно трактовать и как метод (способ) оценки работы холинотропных фармакологических агентов на ПОЛ ткани печени.

## Глава 7

# НЕ-НЕЙРОНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПОЛ ПЕЧЕНИ

### 7.1. Фармакологическая регуляция ПОЛ печени. Основные итоги выполненной работы

Проведенные исследования показали, что группа периферических фармакологических холинотропных средств (антихолинэстеразный препарат периферического типа действия неостигмин, комбинированное применение неостигмина с одним из периферических М- или Н-холиноблокаторов, прямые М- и Н-холиномиметики пилокарпин и никотин, периферические М- и Н-холинолитики атропин и гексаметоний, ацетилхолин, вводимый в ткань печени *in situ*) может влиять на продукты и субстратные составляющие ПОЛ печени в условиях срочных (3 ч) и хронических (5 дней) холодовых нагрузок, создаваемых животным (крысам). Это действие проявляется, прежде всего, по влиянию на содержание продуктов ПОЛ печени: ДК и ГП общих липидов, ДК и ГП фракции СЖК печени, ДК и ГП ОЛ МЭРГ, альдегидного продукта ПОЛ печени – МДА ткани печени, МДА водной фазы МЭРГ. Кроме того, прямые периферические холинотропные фармакологические агенты способны влиять и на изменения содержания и субстратных составляющих ПОЛ печени: *trans*-изомеров ЖК (на примере ЖК  $\Delta^9,12$  C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой), МЭЖК C<sub>20</sub> – DGLA, Арахид, Эйкоза общих липидов, фракции СЖК печени, ТФК и способности гомогената печени продуцировать АФК.

Сопоставление данных, полученных при индуцировании ПОЛ в инкубационной среде ферментативными и неферментативными механизмами в присутствии микросом печени и периферических холинотропных агентов, а также разных комбинаций холинотропных средств, приводят к выводам об отсутствии влияния на содержание продуктов ПОЛ печени только химических элементов, входящих в структуры фармакологических агентов. По результатам экспериментов можно отметить, что прямые, периферические М- и Н-холиномиметики (пилокарпин, никотин) и М- и Н-холинолитики (атропин, гексаметоний) в период 5-дневной холодовой нагрузки способны создавать условия для развития ПОЛ печени. В частности, при этом отмечали изменения в содержании адреналина, НА ткани печени, 2,3-ДФГ эритроцитов крови, происходило изменение и числа двойных связей в липидных фазах печени. Эти данные в основном совпадали с результатами опытов по использованию периферических М- и Н-холиномиметиков и М- и Н-холинолитиков, примененных в модели острого (3 ч) охлаждения животных.

Сопоставление данных, полученных *in vivo* и *in vitro*, при применении комбинаций периферических холинотропных средств, как и отдельного применения прямых холинотропных средств, может служить основанием для выдвигания положения о участии холинергических структур плазматической мембраны гепатоцитов в формировании продуктов и субстратных составляющих ПОЛ печени при острых (3 ч) и хронических (5 дней) холодовых нагрузках.

Несовпадение фактов окисления липидов, полученных при введении животным периферического непрямого М,Н-холиномиметика неостигмина, способствующего накоплению эндогенного АХ за счет блокады ацетилхолинэстеразы в ткани печени, с фактами, полученными при окислении липидов микросом печени в присутствии неостигмина *in vitro*, можно рассматривать как доказательство участия и эндогенного АХ в формировании процесса ПОЛ печени в условиях острой (3 ч) холодовой нагрузки, создаваемой животным. Подтверждением данного допущения могут быть результаты экспериментов по введению АХ в ткань печени *in situ* и сопоставление с результатами окисления липидов микросом печени в присутствии АХ *in vitro*.

На сегодняшний день получены доказательства, свидетельствующие, что в основе феномена одноэлектронного окисления, восстановления ненасыщенных компонентов липидов тканей лежит формирование многих промежуточных продуктов ПОЛ: углерод-центрированных радикалов ЖК [442], перокси-радикалов [410], циклических эндопероксидов [407, 478] с дальнейшей трансформацией их в IsoFs [244, 398, 424] и IsoPs [187], а окислительное  $\beta$ -расщепление PUFAs приводит к образованию не только коротко- и длинноцепочечных, но и циклических альдегидов – изолевугландинов, или изокеталей [178, 179]. Все перечисленные структуры проходят этапы окисления липидов через формирование диеновой конъюгации, создания гидроперекисных групп, при этом данные литературы отмечают способность образующихся циклических эндопероксидов связываться с механизмами GPCRs плазматических мембран клетки [175, 380].

Созданные также ферментативными механизмами ПОЛ циклические эндопероксиды ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{TxA}_2$ ,  $\text{TXB}_2$ ) [427, 428] способны из цитозоля клетки диффундировать (проникать) через плазматическую мембрану клетки и на поверхности мембраны связываться не только с простагландиновыми (простановыми) рецепторами, такими как EP, DP, FP, IP, TP [380], но также и с GPCRs плазматических мембран клетки [175].

Считают, что формирующиеся биологически активные эндопероксиды тканевой среды обладают разноплановыми биологическими эффектами. Так, эндопероксид  $\text{PGF}2\alpha$  приводит к бронхоспазму, к освобождению АХ в ткани печени [331], а эндопероксиды  $\text{TxA}_2$  и  $\text{TXB}_2$  индуцируют агрегацию тромбоцитов и усиливают спазм гладкой мускулатуры [331]. Поэтому, определение изменений в содержании диеновых конъюгатов, гидроперекисей

липидов в липидных фазах и альдегидного продукта ткани печени малонового диальдегида при введении периферических холинотропных средств или их комбинаций в периоды холодовых нагрузок у животных может послужить основой для создания нового направления в науке, демонстрирующего возможности работы холиночувствительных (реактивных) белковых компонентов плазматической мембраны гепатоцитов в условиях активации ПОЛ, созданного холодовыми нагрузками, что, возможно, послужит основой и для создания нового подхода в регуляции СРО липидов, а также для направленного создания нового класса соединений, влияющих на холинергическое звено в период формирования ПОЛ на фоне действия холода.

### **7.2. Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки проблемы**

В работе сформулировано новое направление, демонстрирующее существование и принципы работы холиночувствительных (реактивных) белковых компонентов плазматической мембраны печени в условиях активации перекисного (свободно-радикального) окисления липидов при холодовых нагрузках, что может послужить основой для создания нового подхода в регуляции свободно-радикального окисления липидов гепатоцитов. Важным аспектом работы является возможность направленного создания (синтеза) нового класса соединений, влияющих на холинергическое звено в период формирования перекисного (свободно-радикального) окисления липидов на фоне действия холода. Изучение теоретических основ перекисного (свободно-радикального) окисления липидов и особенностей работы белковых компонентов плазматических мембран холинергической направленности в условиях индуцированного перекисного (свободно-радикального) окисления липидов гепатоцитов холодом может служить теоретической основой для разработок вопросов, связанных с ускорением или замедлением процессов перекисного (свободно-радикального) окисления липидов в организме. Посредством таких механизмов (подходов) возможно потенцирование или предотвращение увеличения выраженности продуктов ПОЛ в период холодовых нагрузок. Следовательно, выяснение основ действия на холинергические механизмы имеет немаловажное значение и для предотвращения типовых патологических процессов, преждевременного износа и раннего старения биологической системы в условиях холода (рис. 25).

Исходя из этих представлений, использование в практической медицине лекарственных средств, обладающих холиномиметическими либо холинолитическими свойствами, будет изменять течение патологических процессов печени, связанных с перекисным (свободно-радикальным) окислением липидов в условиях холодовых нагрузок. Немаловажным направлением развития идей, заложенных в работе, может стать написание соответствующих разделов руководств, учебников, монографий по фармакологии и патофизи-



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Формирование продуктов перекисного окисления липидов в печени, как и его субстратных составляющих, регулируется Н- и М-холинергическими механизмами как в обычных условиях, так и при холодовых нагрузках, в полном соответствии с принципами регуляции синаптической проводимости в холинергических нейронах нервной системы, что доказывается исследованиями *in vitro* и *in vivo* при использовании широкого набора молекулярных мишеней.

Для объективной оценки участия холинергических механизмов отдельных компонентов холинергической системы (мускарино- и никотиночувствительный) в регуляции ими свободно-радикальных процессов ПОЛ печени при острой (3 ч) и хронической (5 суток) холодовой адаптации целесообразно использовать следующие показатели: диеновые конъюгаты общих липидов печени и микросом печени, диеновые конъюгаты фракции свободных жирных кислот печени, гидроперекиси общих липидов печени и микросом печени, гидроперекиси фракции свободных жирных кислот печени, малоновый диальдегид гомогената печени, малоновый диальдегид водной фазы мембран эндоплазматического ретикулума гепатоцитов, содержание ненасыщенных, или двойных связей в липидных экстрактах печени, способность перехода из *cis*-изомеров в *trans*-изомеры жирных кислот на примере жирных кислот  $\Delta 9,12 C_{18:2}$  линолевой, диеновой, общих липидов и фракции свободных жирных кислот печени, жирных кислот мембран эндоплазматического ретикулума Арахидонової, Эйкоза, DGLA общих липидов и фракции свободных жирных кислот печени, содержание молекулярного кислорода в гомогенате печени, способность продуцировать активные формы кислорода гомогенатом печени, содержание  $\alpha$ -токоферола общих липидов печени, содержание 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах крови.

*In vitro* добавление к инкубационной среде холинотропных фармакологических агентов, активирующих холинергические структуры (ацетилхолин, никотин, пилокарпин, неостигмин) либо их угнетающих (гексаметоний, метацин, атропин), в большинстве случаев оказывает разнонаправленное влияние на окисление липидов микросом печени при индуцировании перекисного окисления липидов ферментативными (NADP•H-зависимыми) и неферментативными (аскорбатзависимыми) механизмами как в обычных условиях, так и при срочных (3 ч) и адаптивных (5 дней) холодовых нагрузках. Эта закономерность воспроизводится и при исследованиях *in vivo*.

При срочной (3 ч охлаждения) или хронической (5 суток) холодовой адаптации введение животным (крысам) комбинации фармакологических агентов, приводящей к активации М-холинергического звена холинергической системы (гексаметоний + неостигмин либо отдельно пилокарпин), увеличивает, а блокада М-холинергических механизмов (применение метацина или атропина), напротив, ослабляет выраженность формирования продук-

тов и субстратных составляющих перекисного окисления липидов печени (содержания малонового диальдегида гомогената печени на фоне снижения диеновой конъюгации общих липидов, гидроперекисей общих липидов печени, содержания *trans*-изомеров жирных кислот на примере  $\Delta 9,12$  C<sub>18:2</sub> линолевой, диеновой жирной кислоты, метиловых эфиров жирных кислот Арахидоноидов и Эйкоза фракции свободных жирных кислот печени, продукции активных форм кислорода). Подобные изменения происходят и в системе *in vitro* при добавлении в инкубационную среду фармакологических агентов, стимулирующих М-холинергическое звено холинергической регуляции (гексаметоний + неостигмин либо отдельно пилокарпин) либо ее блокирующих (метацин, атропин).

Ацетилхолин, вводимый в ткань печени *in situ*, ускоряет формирование и увеличивает содержание продуктов перекисного (свободнорадикального) окисления липидов (содержание гидроперекисей общих липидов печени, малонового альдегида гомогената печени на фоне снижения диеновой конъюгации общих липидов печени). Ацетилхолин также повышает содержание и субстратное обеспечение перекисного (свободно-радикального) окисления липидов печени (метиловых эфиров жирных кислот Арахидоноидов и Эйкоза), уменьшая содержание  $\alpha$ -токоферола общих липидов печени. *In vitro* присутствие ацетилхолина в инкубационной среде уменьшает окисление липидов микросом печени при индуцировании как неферментативных, так и ферментативных механизмов перекисного (свободно-радикального) окисления липидов.

Активация М-холинергического звена холинергической регуляции печени путем введения антихолинэстеразного препарата неостигмина на фоне периферического неселективного Н-холиноблокатора гексаметония либо отдельно М-холиномиметика пилокарпина и холодовой нагрузки (3 ч либо 5 дней) активирует перекисное (свободно-радикальное) окисление липидов, увеличивая содержание диеновой конъюгации и гидроперекисей фракции свободных жирных кислот печени, гидроперекисей общих липидов микросом печени, малонового диальдегида гомогената печени, малонового диальдегида водной фазы мембран эндоплазматического ретикула гепатоцитов, *trans*-изомеров C<sub>18:2</sub>  $\Delta 9,12$  линолевой, диеновой жирной кислоты, метиловых эфиров Арахидоноидов фракции свободных жирных кислот, триплетной формы кислорода гомогената печени,  $\alpha$ -токоферола общих липидов печени.

Напротив, активация Н-холинергического звена холинергической регуляции печени путем введения антихолинэстеразного препарата неостигмина на фоне периферического М-холиноблокатора метацина либо отдельно Н-холиномиметика никотина и холодовой нагрузки (3 ч либо 5 дней) ослабляет перекисное (свободно-радикальное) окисления липидов, снижая содержание диеновых конъюгатов общих липидов печени, диеновых конъюгатов общих липидов микросом печени, диеновых конъюгатов и гидроперекисей фракции свободных жирных кислот печени, гидроперекисей общих

липидов микросом печени, малонового диальдегида гомогената печени, малонового диальдегида водной фазы мембран эндоплазматического ретикулума гепатоцитов, *trans*-изомеров  $C_{18,2} \Delta 9,12$  линолевой, диеновой жирной кислоты, метиловых эфиров Арахиса фракции СЖК, триплетной формы кислорода гомогената печени,  $\alpha$ -токоферола общих липидов печени, способность гомогената печени продуцировать активные формы кислорода, содержание 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах крови. Действие комбинации неостигмин + метацин менее выражено, чем фармакологические эффекты никотина, которые проявляются ярко и однонаправленно, независимо от исследованной дозы фармакологического агента.

*In vitro* окисление липидов микросом печени в инкубационной среде с присутствием М-холинолитика метацина при индуцировании перекисного окисления липидов неферментативными и ферментативными механизмами усиливает окисление липидов микросом печени. Атропин действует несколько иначе, увеличивая окисление липидов микросом печени при индуцировании неферментативных механизмов и уменьшая окисление липидов микросом печени при индуцировании ферментативных механизмов перекисного (свободно-радикального) окисления липидов. Напротив, Н-холиноблокатор гексаметоний уменьшает способность липидов микросом печени к окислению при индуцировании неферментативных механизмов, но увеличивает перекисное окисление липидов при индуцировании ферментативных механизмов. Никотин уменьшает окисление липидов микросом печени при индуцировании ферментативных механизмов перекисного (свободно-радикального) окисления липидов, но увеличивает окисление при активации неферментативных механизмов перекисного окисления липидов.

*In vivo* и *in vitro* М- и Н-холинергические механизмы не только регулируют образование продуктов и субстратных составляющих перекисного окисления липидов печени при срочной (3 ч охлаждения) или хронической (5 суток) голодовой адаптации через соответствующие рецепторные образования плазматических мембран гепатоцитов печени, но и работают по принципу взаимодополнительности или даже отчасти реципрокности, когда активация М-холинергического звена холинергической системы затормаживает активность Н-холинергического компонента системы, и наоборот, повышение активности Н-холинергического звена тормозит функцию М-холинергической системы гепатоцитов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Авцын, А.П.* Циркумпольярный гипоксический синдром / А.П. Авцын, А.Г. Марачёв, Л.Н. Матвеев // Вестник АМН СССР. – 1976. – № 6. – С. 32–39.
2. *Аничков, С.В.* Избирательное действие медиаторных средств / С.В. Аничков. – М.: Медицина, 1974. – 291 с.
3. *Аничков, С.В.* Проблема избирательного действия лекарственных веществ на центральную нервную систему / С.В. Аничков // Центральное действие лекарственных веществ на центральную нервную систему. – Л.: Медицина, 1958. – С. 5–15.
4. *Аничков, С.В.* Фармакологическая характеристика холинорецепторов центральной нервной системы / С.В. Аничков, М.А. Гребёнкина // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1946. – Т. 22, № 3. – 28 с.
5. *Аничков, С.В.* Нейрогенные дистрофии и их фармакотерапия / С.В. Аничков, И.С. Завадская, Е.В. Морева, З.И. Веденева. – Л.: Медицина, 1969. – 250 с.
6. *Апчел, В.Я.* Стресс и стрессоустойчивость человека / В.Я. Апчел, В.Н. Цыган. – СПб., 1999. – 86 с.
7. *Арчаков, А.И.* Микросомальное окисление / А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1975. – 327 с.
8. *Баженов, Ю.И.* Термогенез и мышечная деятельность при адаптации к холоду / Ю.И. Баженов. – Л.: Наука, 1981. – 104 с.
9. *Байшукурова, А.К.* Образование 2,3 – ДФГ в эритроцитах при экспериментальных воздействиях, изменяющих условия транспорта кислорода: дис. ... канд. биол. наук : 03.00.13 / Байшукурова Анара Кадыркуловна. – Л., 1983. – 137 с.
10. *Барабой, В.А.* Перекисное окисление и стресс / В.А. Барабой, И.И. Брехман, В.Г. Голотин, Ю.Б. Кудряшов. – СПб.: Наука, 1992. – 148 с.
11. *Бах, А.Н.* О роли перекисей в процессах медленного окисления / А.Н. Бах // Журн. Рус. физ.-хим. общ-ва. – 1897. – Т. 29, № 6. – С. 373–398.
12. *Бах, А.Н.* Химия дыхательных процессов / А.Н. Бах // Собр. Тр. по химии и биохимии. – М.: Изд-во АН СССР, 1980. – С. 50–111.
13. *Богрицевич, Ю.И.* Исследования изменений метаболизма липидов и теплообмена в условиях кратковременного и длительного воздействия холода и тепла на животных в эксперименте / Ю.И. Богрицевич, А.И. Кубарко, А.Г. Третьякович [и др.] // Физиология и фармакология терморегуляции. – Минск, 1978. – С. 13–26.
14. *Бойко, Н.В.* Биохимические показатели компенсации постгеморрагической анемии у больных с носовыми кровотечениями / Н.В. Бойко, Т.С. Колмакова, В.В. Быкова // Вестн. оториноларингологии. – 2010. – № 4. – С. 13–16.
15. *Бородин, А.Е.* Перекисное окисление липидов и функциональные свойства эритроцитов при действии холода / А.Е. Бородин, В.А. Доровских, Г.П. Бородина [и др.] // Бюл. СО РАМН. – 1992. – Т. 12, № 4. – С. 79–84.

16. *Бородин, Е.А.* Инактивация цитохрома Р-450 в мембранах микросом повреждённых Fe<sup>2+</sup>-аскорбатзависимым перекисным окислением липидов / Е.А. Бородин // Биол. науки. – 1986. – № 5. – С. 30–34.

17. *Бородин, Е.А.* Перекисное окисление липидов в мембранах эритроцитов и микросом печени и антиокислительная система тканей крыс при длительном действии холода / Е.А. Бородин, Г.П. Бородин, В.А. Доровских [и др.] // Биол. мембраны. – 1992. – Т. 9, № 6. – С. 622–627.

18. *Бородин, Е.А.* Стабилизация и реактивация цитохрома Р-450 фосфатидилхолином при перекисном окислении липидов / Е.А. Бородин, А.И. Арчаков // Биол. мембраны. – 1987. – Т. 7. – С. 719–728.

19. *Браун, А.Д.* Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы / А.Д. Браун, Т.П. Моженко. – Л.: Наука, 1981. – 231 с.

20. *Бушуева, Е.А.* Новый подход к лечению язвенной болезни с учётом взаимодействия М - и Н-холинергических механизмов: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Бушуева Елена Александровна. – СПб., 1993. – 16 с.

21. *Васильева, Е.М.* Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии / Е.М. Васильева // Биомед. химия. – 2005. – Т. 51, Вып. 2. – С. 118–126.

22. *Васьковский, В.Е.* Липиды / В.Е. Васьковский // Сорский образоват. журнал. – 1997. – № 3. – С. 32–37.

23. *Виноградова, И.Л.* Неферментативный метод определения 2,3 – дифосфоглицериновой кислоты в эритроцитах / И.Л. Виноградова, С.Ю. Багрянцева, Г.В. Дервиз // Лаб. дело. – 1976. – №8. – С. 490–492.

24. *Владимиров, Ю.А.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 250 с.

25. *Владимиров, Ю.А.* Биологические мембраны и патология клетки / Ю.А. Владимиров. – М., 1979. – 231 с.

26. *Гейеровский, Я.* Основы полярнографии / Я. Гейеровский, Я. Кута. – М.: Мир, 1965. – 559 с.

27. *Гланц, С.* Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

28. *Гончаренко, Е.Н.* Химическая защита от лучевого поражения / Е.Н. Гончаренко, Ю.Б. Кудряшов. – М.: МГУ, 1985. – 249 с.

29. *Гурин, В.Н.* Некоторые биохимические механизмы гипоталамических воздействий на стресс – реакции / В.Н. Гурин, А.А. Логинов, И.В. Романовский [и др.] // Биохимия и патохимия обмена веществ и механизмы его регуляции. – Беларусь: Минск, 1971. – С. 50–55.

30. *Гурин, В.Н.* Обмен липидов при гипотермии, гипертермии и лихорадке / В.Н. Гурин. – Минск, 1986. – С. 7–57.

31. *Гурин, В.Н.* Холинергические механизмы в регуляции обмена свободных жирных кислот / В.Н. Гурин // Фармакологическая регуляция обменных процессов: краткие тез. Республ. конф. – Л., 1972а. – С. 11–14.

32. *Гурин, В.Н.* Холинергические механизмы регуляции обменных процессов / В.Н. Гурин. – Минск, 1975. – 142 с.

33. *Гурин, В.Н.* Холинергический контроль адренокортикальных реакций и трофики организма / В.Н. Гурин // *Здравоохранение Белоруссии*. – 1971. – № 10. – С. 52–55.

34. *Гурин, В.Н.* Влияние блокады и возбуждения М-холинореактивных систем на уровень свободных жирных кислот, кетоновых тел и сахара в крови крыс / В.Н. Гурин, Ю.И. Богрицевич // *Фармакол. и токсикол.* – 1972б. – Т. 35, № 6. – С. 691–695.

35. *Гурин, В.Н.* Холинергические механизмы в функциональных системах контроля стресс – реакций / В.Н. Гурин, Ю.И. Богрицевич // *Механизмы мозга и математические методы диагностики*. – Минск, 1971. – С.23–26.

36. *Гурин, В.Н.* Влияние блокады и возбуждения Н-холинореактивных систем на уровень свободных жирных кислот, кетоновых тел и сахара в крови крыс / В.Н. Гурин, П.П. Денисенко // *Фармакол. и токсикол.* – 1972а. – Т.35, №5. – С.615–619.

37. *Дейл, Г.* Действие некоторых эфиров холина и их отношение к мускарину / Г. Дейл // *Теория химической передачи нервного импульса. Этапы развития*. – Л.: Наука, 1981. – С. 35–56.

38. *Денисенко, П.П.* Роль холино-реактивных систем в механизмах стрессовых реакций / П.П. Денисенко // *Стресс и его патогенетические механизмы*. – Кишинёв, 1973. – С. 20–22.

39. *Денисенко, П.П.* Роль холино-реактивных систем в регуляторных процессах / П.П. Денисенко. – М.: Медицина, 1980. – 295 с.

40. *Денисенко, П.П.* Теоретические предпосылки для клинического использования веществ, влияющих на холинореактивные системы / П.П. Денисенко // *Фармакологическая регуляция жизнедеятельности организма через холинергические системы: тез. докл. конф.* – Л.: Наука, 1970. – С. 340–346.

41. *Денисенко, П.П.* Участие холино-реактивных систем в регуляторных процессах / П.П. Денисенко // *Фармакологическая регуляция жизнедеятельности организма через холинергические системы*. – Л.: Наука, 1979. – С. 176–177.

42. *Денисенко, П.П.* Фармакологическая регуляция обменных процессов как способ управления жизнедеятельностью организма / П.П. Денисенко // *Фармакологическая регуляция обменных процессов: тезисы докл. республ. конф.* – Л., 1972. – С. 15–16.

43. *Денисенко, П.П.* Центральные холинолитики / П.П. Денисенко. – Л.: Медицина, 1965. – 290 с.

44. *Доровских, В.А.* Фармакологическая коррекция холодового воздействия в эксперименте: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.06 / Доровских Владимир Анатольевич. – Благовещенск, 1987. – 52 с.

45. *Дорошенко, Г.К.* Активация перекисного окисления липидов в микросомах печени крыс при длительном холодовом воздействии / Г.К. Дорошенко, Г.П. Бородина, Е.А. Бородин [и др.] // Успехи современной криобиологии: тез. докл. 2 междунар. конф. – Харьков, 1992. – 60 с.

46. *Дорошенко, Г.К.* Перекисное окисление липидов и антиокислительная система тканей при длительном действии холода на организм: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.03 / Дорошенко Галина Константиновна. – Благовещенск, 1995. – 89 с.

47. *Заводская, И.С.* Фармакологический анализ механизмов стресса и его последствий / И.С. Заводская, Е.В. Морева. – Л.: Медицина, 1981. – 214 с.

48. *Зеймаль, Э.В.* Мускариновые холинорецепторы / Э.В. Зеймаль, С.А. Шелковников. – Л.: Наука, 1989. – 289 с.

49. *Зенков, Н.К.* Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. – М.: МАИК «Наука - Интерпериодика», 2000. – 343 с.

50. *Зенков, Н.К.* Фенольные биоантиоксиданты / Н.К. Зенков, Н.В. Кандалинцева, В.З. Ланкин [и др.] – Новосибирск: СО РАМН, 2003. – 328 с.

51. *Казначеев, В.П.* Современные аспекты адаптации / В.П. Казначеев. – Новосибирск: Наука, 1980. – 247 с.

52. *Казначеев, В.П.* Синдром полярного напряжения и некоторые вопросы экологии человека в высоких широтах / В.П. Казначеев, В.Ю. Куликов // Вестн. АМН СССР. – 1980. – Т. 1. – С. 74–82.

53. *Камкин, А.Г.* Физиология и молекулярная биология мембран клеток: учебное пособие для студентов высших медицинских заведений / А.Г. Камкин, И.С. Киселёва. – М.: Издательский центр «Академия», 2008. – 592 с.

54. *Камышников, В.С.* Справочник по клинико - биохимической лабораторной диагностике / В.С. Камышников. – М.: Беларусь, 2002. – Т. 2. – 463 с.

55. *Карузина, И.И.* Выделение микросомальной фракции печени и характеристика её окислительных систем / И.И. Карузина, А.И. Арчаков // Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 49–59.

56. *Кейтс, М.* Техника липидологии / М. Кейтс. – М.: Мир, 1975. – 321 с.

57. *Киселевич, Р.Ж.* Определение витамина Е в сыворотке крови / Р.Ж. Киселевич, С.И. Скварко // Лаб. дело. – 1972. – № 8. – С. 473–475.

58. *Колб, В.Г.* Клиническая биохимия / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск, 1976. – С. 217–219.

59. *Круглова, О.Г.* Влияние дигидрохверцетина на перекисное окисление липидов в условиях холодового воздействия: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06 / Круглова Ольга Геннадьевна. – Благовещенск, 2014. – 235 с.

60. *Круглова, О.Г.* Влияние дигидрохверцетина на продукты перекисного окисления липидов при холодовом воздействии / О.Г. Круглова, В.А. Доровских, В.И. Тиханов [и др.] // Дальневосточный мед. журнал. – 2011. – № 3. – С. 90–92.

61. *Круглова, О.Г.* Сравнительная характеристика влияния дигидрохверцетина и витамина Е на продукты перекисного окисления липидов в крови лабораторных животных при холодовом воздействии / О.Г. Круглова, В.А. Доровских, В.И. Тиханов [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. – 2011. – Вып. 40. – С. 71–73.

62. *Кубарко, А.И.* Исследование взаимосвязи между физико-химическими свойствами липидов мозга крови животных и человека, температурой тела и физиологическим состоянием организма / А.И. Кубарко // Физиология и фармакология терморегуляции. – Минск, 1978. – С.73–79.

63. *Кубарко, А.И.* Системная регуляция и физиологическая роль фазовых состояний липидов в организме: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 03.03.01 / Кубарко Алексей Иванович. – Минск, 1983. – 36 с.

64. *Кузин, А.М.* Структурно-метаболическая теория в радиобиологии / А.М. Кузин. – М.: Наука, 1986. – 282 с.

65. *Куликов, В.Ю.* Реакции свободно-радикального окисления липидов и некоторые показатели кислородного обмена / В.Ю. Куликов, В.В. Ляхович // Механизмы адаптации человека в условиях высоких широт. – Л.: Медицина, 1980. – С. 50–60.

66. *Куликов, В.Ю.* Гидроперекиси жирных кислот, флуоресцирующие продукты и концентрация токоферола в тканях кроликов при действии на них холода / В.Ю. Куликов, М.Т. Луценко, Л.И. Колесникова [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1980. – № 12. – С. 681–682.

67. *Куликов, В.Ю.* Реакции перекисного окисления липидов в процессах адаптации и патологии органов дыхания в регионах Крайнего Севера и Центрального участка БАМ / В.Ю. Куликов, В.П. Казначеев, Н.И. Сереброва [и др.] // Современные проблемы общей патологии в аспекте адаптации. – Новосибирск: Наука, 1980. – 251 с.

68. *Куликов, В.Ю.* Реакции свободнорадикального окисления липидов и некоторые показатели кислородного обмена / В.Ю. Куликов, В.В. Ляхович // Механизмы адаптации человека в условиях высоких широт. – Л.: Медицина, 1980. – С. 50–60.

69. *Левачев, М.М.* Транс-изомеры жирных кислот: пока бояться нечего / М.М. Левачев // Химия и жизнь. – 1999. – № 8. – С. 1–5.

70. *Лосев, Н.А.* Взаимодействие М- и Н- холинергических механизмов в центральной нервной системе: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.25 / Лосев Николай Андреевич. – Л., 1987. – 54 с.

71. *Лосев, Н.А.* Влияние холиномиметиков ареколина и никотина на лимбико-ретикулярный комплекс / Н.А. Лосев // Ретикулярная функция биогенных аминов: тез. докл. Всесоюзн. науч. конф. – Л., 1970. – С. 67–68.

72. *Лосев, Н.А.* Фармакология – клинике (с учётом взаимодействия М- и Н-холинергических механизмов) / Н.А. Лосев // Актовая речь на заседании Учёного совета Института экспериментальной медицины. – СПб., 2007. – 44 с.

73. *Лосев Н.А.* Фармакология новых холинергических средств (фармакология – клинике) / Н.А. Лосев, Н.С. Сапронов, Л.К. Хныченко [и др.]. – СПб.: Арт-экспресс, 2015. – 368 с.

74. *Лосев, Н.А.* Зависимость фармакологического эффекта холинергических соединений от наличия в их молекулах гидроксила и алкильных радикалов / Н.А. Лосев // *Нейрофармакология (новые препараты в неврологии): тез. докл. Всесоюзн. конф.* – Л., 1980. – С. 108–110.

75. *Лосев, Н.А.* Новые данные о применении холинергических средств / Н.А. Лосев, П.Д. Шабанов // *Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии.* – 2017. – Т. 15, спецвып. № 2. – С. 47–48.

76. *Малыгина, Е.И.* Влияние центральных холинолитиков на гипергликемию при травматическом шоке / Е.И. Малыгина, В.И. Петухов // *Фармакология центральных холинолитиков и других нейротропных средств.* – Л.: Медицина, 1969. – С.125–154.

77. *Мантейфель, В.М.* Роль митохондриального аппарата лимфоцитов и их реакции на ионизирующее излучение / В.М. Мантейфель, М.Н. Мейсель // *Изв. АН. СССР. Сер. Биол.* – 1965. – № 6. – 884 с.

78. *Матлина, Э.М.* Обмен катехоламинов в гормональном и медиаторном звеньях симпато – адреналовой системы при стрессе / Э.М. Матлина // *Успехи физиол. наук.* – 1972. – Т. 3, № 4. – С. 92–130.

79. *Машковский, М.Д.* Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – М.: Новая волна, 2012. – 1216 с.

80. *Меерсон, Ф.З.* Адаптационная медицина: механизмы и защитные эффекты адаптации / Ф.З. Меерсон. – М.: Нурохиа Medical LTD, 1993. – 331 с.

81. *Меерсон, Ф.З.* Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам / Ф.З. Меерсон, М.Г. Пшенникова. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.

82. *Меерсон, Ф.З.* Адаптационная медицина: концепция долговременной адаптации / Ф.З. Меерсон. – М.: Дело, 1993. – 138 с.

83. *Меерсон, Ф.З.* Развитие адаптации к стрессу в результате курса транскраниальной электростимуляции / Ф.З. Меерсон, М.Г. Пшенникова, Б.А. Кузнецова [и др.] // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* – 1994. – №1. – С.16–18.

84. *Меерсон, Ф.З.* Феномен адаптационной стабилизации структур и защита сердца / Ф.З. Меерсон, И.Ю. Малышев. – М.: Наука, 1993. – 160 с.

85. *Меньщикова, Е.Б.* Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков [и др.]. – М.: Слово, 2006. – 556 с.

86. *Меньщикова, Е.Б.* Окислительный стресс: Патологическое состояние и заболевания / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин [и др.]. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.

87. *Метелица, Д.И.* Активация кислорода ферментными системами / Д.И. Метелица. – М.: Наука, 1982. – 256 с.

88. *Михайлов, В.В.* Основы патологической физиологии. Руководство для врачей / В.В. Михайлов. – М.: Медицина, 2001. – 704 с.

89. *Моргунова, Т.В., Лазарева Д.Н.* Влияние лекарственных средств на свободно – радикальное окисление / Т.В. Моргунова, Д.Н. Лазарева // Эксперим. и клин. фармакология. – 2000. – Т. 63, № 1. – С. 71–75.
90. *Надточий, Е.В.* Функция внешнего дыхания и газотранспортная функция эритроцитов у больных бронхиальной астмой / Е.В. Надточий // Бюл. Дальневосточного научн. центра физиол. и патол. дыхания СО РАМН. – 2007. – Вып. 24. – С. 76–78.
91. *Наумов, Д.Е.* Генетический полиморфизм термочувствительных катионных каналов TRPM8 как фактор предрасположенности к холодовой гиперреактивности дыхательных путей у больных хроническими обструктивными заболеваниями легких / Д.Е. Наумов, Ю.М. Перельман, В.П. Колосов [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. – 2012. – Вып. 45. – С. 8–14.
92. *Некрасов, Э.В.* Фосфолипаза D растений. Распространение, возможная физиологическая роль: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / Некрасов Эдуард Витальевич. – Благовещенск, 2000. – 136 с.
93. *Николайчик, Е.А.* Регуляция метаболизма: курс лекций / Е.А. Николайчик. – Минск, 2009. – С. 1–29.
94. *Пастухов, Ю.Ф.*  $\beta$ -Адренергические механизмы холодовой адаптации / Ю.Ф. Пастухов // Биологические проблемы Севера. – Магадан, 1974. – Вып. 3. – 160 с.
95. *Пастухов, Ю.Ф.* Действие адренергических веществ при экспериментальной и природной адаптации к холоду / Ю.Ф. Пастухов // Процессы адаптации и биологически активные вещества. – Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1976. – С. 126–136.
96. *Пастухов, Ю.Ф.* Адренергический контроль термогенеза при экспериментальной и природной адаптации животных к холоду / Ю.Ф. Пастухов, В.В. Хаскин // Успехи физиол. наук. – 1979. – № 10. – С.121–142.
97. *Педиатрия: национальное руководство.* – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2009. – Т. 1. – 1024 с.
98. *Петечинская, К.В.* Роль ассоциации глицеральдегид-3- фосфатдегидрогеназы с другими ферментами в регуляции образования 2,3- дифосфоглицерата в эритроцитах: дисс. ... канд. биол. наук / К.В. Петечинская. – Москва, 1998. – 142 с.
99. *Пшениčkова, М.Г.* Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии / М.Г. Пшениčkова // Актуальные проблемы патофизиологии: избранные лекции / Под ред. Б.Б. Мороза. – М.: Медицина, 2001. – 424 с.
100. *Пшениčkова, М.Г.* Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии / М.Г. Пшениčkова // Патол. физиол. и эксп. терапия. – 2001. – № 2. – С.26–30.
101. *Реброва, О.Ю.* Статистический анализ медицинских данных / О.Ю. Реброва. – М: Медиа Сфера, 2002. – 312 с.
102. *Розен, В.Б.* Основы эндокринологии / В.Б. Розен. – М.: МГУ, 1994. – 384 с.

103. Романова, Л.А. Метод определения гидроперекисей липидов с помощью тиоционата аммония / Л.А. Романова, И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 64–66.

104. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / Под ред. Г.М. Франка. – М.: Наука, 1973. – 220 с.

105. Сапронов, Н.С. Стрессорные нарушения метаболизма и их фармакокоррекция / Н.С. Сапронов, Л.К. Хныченко, С.Е. Шелемеха. – СПб., 2009. – 240 с.

106. Сапронов, Н.С. Холинергические механизмы регуляции мужской половой функции / Н.С. Сапронов, А.А. Байрамов. – СПб.: Арт-экспресс, 2013. – 272 с.

107. Селезнёв, К.А. Аналитическая химия / К.А. Селезнёв. – М.: Высшая школа, 1966. – 312 с.

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

109. Симонова, Н.В. Фитопрепараты в коррекции процессов перекисного окисления липидов биомембран, индуцированных ультрафиолетовым облучением: дис. ... д-ра биол. наук: 06.02.01 / Симонова Наталья Владимировна. – Благовещенск, 2012. – 302 с.

110. Сологубова, Е.К. Физиологические основы сочетанного применения фармако- и нейростимуляции для восстановления проводимости повреждённых зрительных нервов: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.0013 / Сологубова Елена Красномировна. – СПб., 1996. – 18 с.

111. Досон, Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот [и др.]; пер. с англ. – М.: Мир, 1991. – 544 с.

112. Стальная, И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 64–66.

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

114. Скулачёв, В.П. Трансформация энергии в биомембранах / В.П. Скулачёв. – М.: Наука, 1972. – 202 с.

115. Титов В.Н., Лисицын Д.М. Жирные кислоты. Физическая химия, биология и медицина / В.Н. Титов, Д.М. Лисицын. – М.; Тверь: Триада, 2006. – 672 с.

116. Тиханов, В.И. Влияние периферических модуляторов холинергии на перекисное окисление липидов, в период длительной холодной нагрузки / В.И. Тиханов, В.А. Доровских, Р.А. Анохина, Е.П. Миронюк // Современные аспекты диагностики, лечения и профилактики заболеваний человека. – Благовещенск, 2002. – Т. 12. – С. 568–574.

117. Тиханов, В.И. Влияние центральных и периферических М-, Н- холинотропных агонистов и М-,Н-холиноблокаторов на формирование холодовой адаптации: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.25 / Тиханов Виктор Иванович. – Ленинград, 1988. – 190 с.

118. Тиханов, В.И. Влияние центральных М- и Н-холинореактивных структур на формирование процесса холодовой адаптации / В.И. Тиханов, П.П. Денисенко, В.А. Доровских // Фармакологическая коррекция стрессирующих воздействий в эксперименте / под ред. В.А. Доровских. – Благовещенск, 1985. – С. 34–36.

119. Тиханов, В.И. Изменение продуктов и субстратных составляющих перекисного окисления липидов в ткани печени на фоне холодовой нагрузки и введении непрямых мускарино-чувствительных и никотино-чувствительных холинотропных агонистов / В.И. Тиханов, Н.А. Лосев, В.А. Доровских [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. – 2013. – Вып. 50. – С. 61–67.

120. Тиханов, В.И. Продукты и субстратные составляющие перекисного окисления липидов ткани печени при введении ацетилхолина *in situ* / В.И. Тиханов, Н.А. Лосев, В.А. Доровских [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. – 2015. – Вып. 55. – С. 101–107.

121. Тиханов, В.И. Сопоставление перекисного окисления липидов микросом печени *in vitro* в присутствии пилокарпина, атропина с перекисным окислением липидов печени *in vivo* при введении периферического мускарино-чувствительного миметика, литика на фоне холодовой нагрузки / В.И. Тиханов // Дальневосточный мед. журнал. – 2015. – № 2. – С. 96–101.

122. Тиханов, В.И. Способ изменения содержания продуктов перекисного, свободнорадикального окисления липидов: диеновые конъюгаты, гидроперекиси в общих липидах печени, лёгкого, миокарда, крови, маломолекулярного диальдегида в водной фазе гомогената печени, миокарда, лёгкого, крови, вызванного одновременным или избирательным возбуждением периферических мускарино-чувствительных, никотино-чувствительных холинореактивных структур плазматической мембраны клеток с использованием антихолинэстеразных механизмов накопления эндогенного ацетилхолина, в условиях холодовой нагрузки, в эксперименте / В.И. Тиханов, Н.А. Лосев, Д.П. Решодько [и др.] // Патент России № 2438187. – 2011. – Бюл. № 36.

123. Тиханов, В.И. Сравнение окислительной активности прозерина при кратковременной холодовой нагрузке *in vivo* и *in vitro* / В.И. Тиханов, Н.А. Лосев, В. А. Доровских [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. – 2013. – Вып. 49. – С. 77–81.

124. Тиханов, В.И. Окисление ацетилхолина и липидов микросом печени *in vitro* / В.И. Тиханов, Н.А. Лосев, В.А. Доровских [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. – 2014. – Вып. 54. – С. 79–81.

125. Тиханов, В.И. Поляриметрическое устройство для определения содержания молекулярного кислорода в гомогенатах исследуемых тканей и

способ его применения / В.И. Тиханов, Д.П. Решодько, О.Н. Варганов // Патент России №2348926. – 2009. – Бюл. № 7.

126. *Тиханов, В.И.* Реципрокность в продуктах перекисного окисления липидов микросом печени, фракции свободных жирных кислот печени на фоне введения пилокарпина, атропина *in vivo* в период холодого воздействия / В.И. Тиханов // Дальневосточный мед. журнал. – 2015. – № 2. – С. 92–95.

127. *Тиханов, В.И.* Триплетная и активная формы кислорода ткани печени экспериментальных животных на фоне охлаждения и введения ацетилхолина в ткань печени *in situ* / В.И. Тиханов, Н.А. Лосев, В.А. Доровских [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. – 2015. – Вып. 56. – С. 107–112.

128. *Тиханов, В.И.* Влияние холинотропных средств на изменение содержания триплетной формы кислорода ткани печени и способности гомогената печени продуцировать активные формы кислорода при охлаждении у крыс / В.И. Тиханов // Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. – 2016. – Т. 14, № 4. – С. 3–8.

129. *Тиханов, В.И.* Изменение содержания продуктов перекисного (свободнорадикального) окисления липидов печени, вызываемого неостигмином, на фоне предварительного введения животным гексаметония и 3-часового охлаждения животных / В.И. Тиханов // Дальневосточный мед. журнал. – 2016. – № 2. – С. 92–96.

130. *Тиханов, В.И.* 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* / В.И. Тиханов // Дальневосточный мед. журнал. – 2016. – № 1. – С. 86–88.

131. *Тиханов, В.И.* 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* / В.И. Тиханов // Дальневосточный мед. журнал. – 2016. – № 1. – С. 86–88.

132. *Тиханов, В.И.* Фармакологический анализ изменений содержания диеновой конъюгации, метиловых эфиров жирных кислот фракций липидов печени холинотропными средствами на фоне переохлаждения крыс / В.И. Тиханов, П.Д. Шабанов // Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. – 2017. – Т. 15, № 1. – С. 33–40.

133. *Ушкалова, В.Н.* Контроль перекисного окисления липидов / В.Н. Ушкалова, Н.В. Иоанидис, Г.Д. Кадочникова [и др.]. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 1993. – 182 с.

134. *Филимонов, В.И.* Руководство по общей и клинической физиологии / В.И. Филимонов. – М.: Мед. информ. агенство, 2002. – 958 с.

135. Царюк, В.В. Фармакологический анализ центральных холинергических механизмов в терморегуляции / В.В. Царюк // Физиология и фармакология терморегуляции. – Минск, 1978. – С.60–74.

136. Шайтор, В.М. Физиологические механизмы восстановления движений при лечении спастических форм детского церебрального паралича приёмами функционального биоуправления на фоне традиционной фармакотерапии: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.13 / Шайтор Валентина Михайловна. – Л., 1989. – 209 с.

137. Шаляпина, В.Г. Физиология и биохимия биогенных аминов. К вопросу о роли норадреналина мозга в регуляции гипофизарно-адреналовой системы / В.Г. Шаляпина. – М.: Медицина, 1969. – С.111–114.

138. Шаповаленко, Н.С. Фармакологическая регуляция теплового, холодового воздействия в эксперименте: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06 / Шаповаленко Наталья Сергеевна. – Благовещенск, 2011. – 235 с.

139. Шелковников, С.А. Новые данные о гетерогенности мускариновых рецепторов / С.А. Шелковников // Итоги науки техники. ВИНТИ. Фармакология. Химиотерапевтические средства. – М., 1991. – Т. 25. – С.1–83.

140. Штарберг, М.А. Антиокислительные свойства комбинированных препаратов фосфолипидов с производными малоновой и тиобарбитуровой кислот: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.04 / Штарберг Михаил Анатольевич. – Чита, 1996. – 21 с.

141. Эммануэль, Н.М. Кинетика и механизм цепных реакций жидко-фазного окисления углеводов. Проблемы кинетики элементарных химических реакций / Н.М. Эммануэль. – М.: Наука, 1973. – С.31–50.

142. Эскин, И.А. Физиология и биохимия биогенных аминов / И.А. Эскин, З.Н. Щедрина, В.М. Розенталь // Катехоламины и гипоталамическая регуляция системы гипофиз – кора надпочечников. – М.: Наука, 1969. – С.106–111.

143. Agius, L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism / L. Agius // J. Biochem. – 2008. – Vol. 414. – P. 1–18. doi: 10.1042/BJ20080595

144. Aisslaitner, G. In vitro studies on (-) nornicotine / G. Aisslaitner, Y. Li, J. W. Gorrod // Medical Sci. Res. – 1992. – Vol. 20. – P. 897–899.

145. Al-Khazraji, B.K. A simple “streak length method” for quantifying and characterizing red blood flow in rat skeletal muscle arterioles / B.K. Al - Khazraji, N.M. Novielli, D. Goldman [et al.] // Microcirculations. – 2012. – Vol. 19. – P. 327–335.

146. Alvarez, O. Large divalent cations and electrostatic potentials adjacent to membranes. Experimental results with hexamethonium / O. Alvarez, M. Brodwick, R. Lattorre, S. McLanghlin [et al.] // J. Biophys. – 1983. – Vol. 44, № 3. – P. 333–342.

147. Aqarwal, R. Rapid fluorimetric – liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples / R. Aqarwal, S.D. Chase // J. Chromatography B. Analyt. Technol. in Biomed. and Life Sci. – 2002. – Vol. 775. – P. 121–126.

148. *Aslop, R.J.* The Lipid Bilayer Provides a Site for Cortisone Crystallization at High Cortisone Concentrations / R.J. Aslop, A. Khondker, J.S. Hub, M.C. Rheinstadter // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P.224–225.

149. *Atsunori, N.* Galantamine and carbon monoxide protect brain microvascular endothelial cells by heme oxygenase - 1 induction / N. Atsunori, Th.E. Starzl, D.J. Kaczorowski, S. Brian [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – Vol. 367, № 3. – P. 674–679.

150. *Axelrod, J.* Phospholipase A<sub>2</sub> and G proteins / J. Axelrod // *Trends Neurosci.* – 1995. – Vol. 18. – P. 64–65.

151. *Babior, B.M.* Superoxide: a two-edged sword / B. M. Babior // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 1997. – Vol. 30, № 2. – P. 141–155.

152. *Baier, J.* Direct detection of singlet oxygen generated by UVA irradiation in human cells and skin / J. Baier, T. Maisch, M. Maier [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 2007. – Vol. 127. – P. 1498–1506.

153. *Baldwin J.M.* Structure and function of receptors coupled to G proteins / J. Baldwin // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1994. – Vol. 6. – P. 180–190.

154. *Baldwin, J.M.* The probable arrangement of the helices in G protein – coupled receptors / J.M. Baldwin // *EMBO J.* – 1993. – Vol. 12. – P. 1693–1703.

155. *Baner, C.E.* Mechanisms for redox control of gene expression / C.E. Baner, S. Elsen, T.H. Bird // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1999. – Vol. 53. – P. 495–523.

156. *Baner M.* Pharmacokinetics of single ascending doses of the P-glycoprotein inhibitor tariquidar in healthy subjects / M. Baner, M. Zeitlinger, D. Todorut [et al.] // *Pharmacology.* – 2013. – Vol. 91, № 1-2. – P.13–19. doi 10.1159/000343243.

157. *Baric, J.* Chronic stress triggers social aversion via glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons / J. Baric, F. Marti, C. Morel [et al.] // *Science.* – 2013. – Vol. 339. – P. 332–335.

158. *Barrera, G.* Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy / G. Barrera // *ISRN Oncol.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 137– 289.

159. *Barry, B.A.* Reaction dynamics and proton coupled electron transfer: studies of tyrosine – based charge transfer in natural and biomimetic systems / B.A. Barry // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – Vol. 1847, №1. – P. 46–54. doi 10.1016/j.bbabi.2014.09.003.

160. *Basn, S.* The enigma of in vivo oxidative stress assessment: isoprostanes as an emerging target / S. Basn // *Scand. J. Food Nutr.* – 2007. – Vol. 51, № 2. – P. 48–81.

161. *Basselin, M.* Resting and arecoline-stimulated brain metabolism and signaling involving arachidonic acid are altered in the cyclooxygenase-2 knockout mouse / M. Basselin, N. E. Villacreses, R. Langenbach [et al.] // *J. Neurochem.* – 2006. – Vol. 96. – P. 669–679.

162. *Becket, A.H.* In vitro metabolic N – oxidation of the minor tobacco alkaloids (-) methylanabasine and (-) anabasine to yield a hydroxylamine and a

nitron in lung and liver homogenates / A.H. Becket, A.H. Shikh // *J. Pharmacol.* – 1973. – Vol. 25. – P. 171.

163. *Benovitz, N.L.* Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method / N.L. Benovitz, P.I. Jacob // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 1994. – Vol. 56. – P. 483–493.

164. *Benovitz, N.* Nicotine chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers / N. Benovitz, J. Hukkanen, P. Jacob // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 192. – P.29–60. doi:10.1007/978-3-540-69248-5 2

165. *Benowitz, N.L.* Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine / N.L. Benowitz, P.I. Jacob, I. Fong, I. Guptas // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2010. – Vol. 268. – P. 296–303.

166. *Berstein, G.* Reconstitution of agonist stimulated phosphatidylinositol 4,5 – biphosphate hydrolysis using purified m 1 muscarinic receptor Gq/11 and phospholipase C  $\beta$  1 / G. Berstein, J.L. Blank, A.V. Smrcka [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 8081–8088.

167. *Bertolucci, C.* Daily rhythms of serum lipids in dogs: influence of lighting and fasting cycle / C. Bertolucci, F. Fazio, G. Piccione // *Comp. Med.* – 2008. – Vol. 58, № 5. – P. 485–489.

168. *Blair, I.A.* DNA adducts with lipid peroxidation products / I.A. Blair // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, № 23. – P. 15545–15549.

169. *Bligh, E.G.* A rapid method of total lipid extraction and purification / E.G. Bligh, W.J. Dyer // *Can. J. Biochem. Physiol.* – 1959. – Vol. 37. – P. 911–917.

170. *Bochkov, V.N.* Generation and biological activities of oxidized phospholipids / V.N. Bochkov, O.V. Oskolkova, K.G. Birukov [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2010. – Vol. 12. – P. 1009–1059.

171. *Boksa, P.* Arachidonic acid inhibits choline uptake and depletes acetylcholine content in rat cerebral cortical synaptosomes / P. Boksa, S. Mykita, B. Collier // *J. Neurochem.* – 1988. – Vol. 50, № 4. – P. 1309–1318.

172. *Bonlonmiē, A.* Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production / A. Bonlonmiē, J. Banersachs, W. Linz [et al.] // *Hypertension.* – 1997. – Vol. 30, № 4. – P. 934–941.

173. *Borodin, E.A.* Lipid peroxidation in erythrocyte membranes and liver microsomes and the antioxidant system of rat tissues under prolonged cold stress / E. A. Borodin, G. P. Borodina, V. A. Dorovskih [et al.] // *Biol. Membr.* – 1993. – № 6. – P. 809–818.

174. *Borst, J.W.* Oxidation of unsaturated phospholipids in membrane bilayer mixtures is accompanied by membrane fluidity change / J.W. Borst, N.V. Visser, O. Kouptsova [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1487. – P. 61–73.

175. *Boss, C.L.* Prostanoids and prostanoids receptor in signal transduction / C.L. Boss, D.J. Riche, T. Ritsema [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 36. – P. 1187–1205.

176. *Bouner, T.I.* The molecular basis of muscarinic receptor diversity / T.I. Bouner // *Trends Neurosci.* – 1989. – Vol. 12. – P. 148–151.

177. *Boveris, A.* Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide / A. Boveris // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1977. – Vol. 78. – P. 67–82.

178. *Brame, C.J.* Identification of extremely reactive gamma – ketoaldehydes (isolevuglandins) as product of the isoprostane pathway and characterization of their lysyl protein adducts / C.J. Brame, R.G. Salomon, J.D. Morrow [ et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 13139–13146.

179. *Brame, C.J.* Modification of proteins by isoketal-containing oxidized phospholipids / C.J. Brame, O. Boutand, S.S. Daviss [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 13447–13451.

180. *Bramhal, M.* Quality of methods reporting in animal models of colitis / M. Bramhal, O. Florez – Vargas, R. Stevens [et al.] // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2015. – Vol. 21, №6. – P. 1248–1259.

181. *Branchand, B.P.* Free radicals as a result of dioxygen metabolism. Metal ions in biological systems / B.P. Branchand. – 1999. – Vol. 36. – P. 79–102.

182. *Brandange, S.* The enzyme «aldehyde oxidase» is an iminium oxidase reaction with nicotine  $-\Delta 1',5'$ -iminium ion / S. Brandange, L. Lindblom // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1979. – Vol. 91. – P. 991–996.

183. *Brash, A.R.* Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis and Acquisition of substrate / A.R. Brash // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 23679–23682.

184. *Brooks, P.C.* Requirement of vascular integrin alpha V beta 3 for angiogenesis / P.C. Brooks, R.A. Clark, D.A. Cheresh // *Science.* – 1994. – Vol. 264. – P. 569–571.

185. *Brown, D.M.* The assay of anti-acetylcholine agents for antagonism of pilocarpine – induced salivation in rabbits / D.M. Brown, R.M. Quinton // *Br. J. Pharmacol. Chemother.* – 1957. – Vol. 12, № 1. – P. 53–60.

186. *Bruton, J.* Increased fatigue resistance linked to Ca<sup>2+</sup> stimulated mitochondrial biogenesis in muscle fibres of cold acclimated mice / J. Bruton, J. Aydin, T. Yamada, I.G. Shsbslina [et al.] // *J. Physiol.* – 2010. – Vol. 588, № 21. – P. 4275–4288. doi: 10.1113 / *physiol.* 2010. 198598.

187. *Buczynski, M.* Thematic review series proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology / M. Buczynski, D. Dumlao, E. Dennis // *J. Lipid Res.* – 2009. – Vol. 50. – P. 1015–1038.

188. *Budd, G.M.* Urinary excretion of adrenal steroids, catecholamines and electrolytes in man before and after acclimatization to cold in Antarctica / G.M. Budd, N. Warhaft // *J. Physiol.* – 1970. – Vol. 2, №10. – P. 799–806.

189. *Buerk, D.G.* Mathematical modeling of the interaction between oxygen, nitric oxide and superoxide / D.G. Buerk // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2009. – Vol. 645. – P. 7–12.

190. *Burn, J.H.* Acetylcholine in adrenergic transmission / J.H. Burn, M. Rand // *Ann. Rev. Pharmacol.* – 1965. – Vol. 5. – 163 p.

191. *Burn, J.H.* A new interpretation of the adrenergic nerve fiber / J.H. Burn, M. Rand // *Ann. Rev. Pharmacol.* – 1962. – Vol. 1. – P. 62.

192. *Cai, J.* Protein modification by acrolein: formation and stability of cysteine adducts / J. Cai, A. Bhatnagar, W.M. Pierce // *Chem. Res. Toxicol.* – 2009. – Vol. 22. – P. 708–716.
193. *Calder, P.C.* Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale / P.C. Calder // *Biochimie.* – 2009. – Vol. 91, № 6. – P. 791–795.
194. *Cameron, G.* Separate FAME cis and trans isomers with DB – 23 / G. Cameron // *J. Lipids.* – 2001. – Vol. 14, № 3. – P. 13.
195. *Campera, M.* Slowly conducting differents activated by innocuous low temperature in human skin / M. Campera, J. Serra, H. Bostock, J.L. Ochoa // *J. Physiol.* – 2001. – Vol. 535, № 3. – P. 855–865.
196. *Capdevila, J.H.* Biochemical and molecular properties of the cytochrome P-450 arachidonic acid monooxygenases / J.H. Capdevila, J.R. Falck // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* – 2002. – Vol. 68. – P. 325–344.
197. *Carnie, S.* Large divalent cations and electrostatic potentials adjacent to membranes. A theoretical calculation / S. Carnie, S. Mclaughlin // *Biophys. J.* – 1983. – Vol. 44, № 3. – P. 325–332.
198. *Carol, A.R.* Cyclooxygenases: structural and functional insights / A.R. Carol, J.L. Marnett // *J. Lipid Res.* – 2009. – Vol. 50, Suppl. 1. – P. 29–34.
199. *Carrelau, J.P.* Adaptation of macro – scale method to the microscale for fatty acid methyl tranesterification of biological lipid extracts / J.P. Carrelau, J.P. Dubaco // *J. Chromatography.* – 1978. – Vol. 151. – P. 384–390.
200. *Carrilla, C.* Activation of human neutrophils by oleic acid involves the production of reactive oxygen species and a rise in cytosolic calcium concentration: a comparison with N-6 poly unsaturated fatty acids / C. Carrilla, M. Del Mar Cavia, H. Roclats [et al.] // *Int. J. Exp. Cell. Physiol.* – 2011. – Vol. 28, № 2. – P. 329–338.
201. *Cashman, J.R.* Metabolism stereoselective formation of trans-nicotine N-oxide / J.R. Cashman, S.B. Park, Z.C. Yang [ et al.] // *Chem. Res. Toxicol.* – 1992. – №5. – P. 639–646.
202. *Cederbaum, A.I.* Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury / A.I. Cederbaum, Y. Lu, D. Wu // *Arch. Toxicol.* – 2009. – Vol. 83, №9. – P. 519–548.
203. *Cederbaum, A.I.* Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications / A.I. Cederbaum // *Redox Biol.* – 2015. – № 4. – P. 60–73.
204. *Cellini, J.* Enhanced nerve stimulated muscarinic and neurokinin contractions of ileum from streptozotocin guinea-pigs / J. Cellini, R. Pommier, R. Porter, K.J. Le Pard // *Auton. Autocoid. Pharmacol.* – 2012. – Vol.32, № 4. – P. 23–39. Doi: 10.1111 / j. 1474-8673. 2012. 00471. x.
205. *Chalimoniuk, M.* Secretory phospholipase A 2 and its role in oxidative stress and inflammation / M. Chalimoniuk // *Postery Biochemii.* – 2012. – Vol. 58, № 2. – P. 204–208.

206. *Chang Bell, M.C.J.* Dynamics of docosahexenoic acid metabolism in the central nervous system: lack of effect of chronic lithium treatment / M.C.J. Chang Bell, J.M. Purdon, E.G. Chikhale, E. Grande // *Neurochem. Res.* – 1999. – Vol. 24. – P. 399–406.
207. *Chellan, P.* The elements of life and medicines / P. Chellan, P.J. Sadler // *Philos Trans. A: Math. Phys. Eng. Sci.* – 2015. – Vol. 373. – P. 20–37. 20140182. doi: 10.1098/rsta.2014.0182
208. *Chenier, J.H.B.* Arrhenius parameters for reaction of tert-butyl peroxy and 2 - ethyl -2 - propyl - peroxy radicals with some nonhindered phenols, aromatic amines, and thiophenols / J.H.B. Chenier, E. Furimsky, J.A. Howard // *Can. J. Chem.* – 1974. – Vol. 52. – P. 3682–3688.
209. *Chrcusos, G.P.* The concepts of stress system disorder: overview of behavioral and physical homeostasis / G.P. Chrcusos, P.W. Gold // *J. Amer. Med. Assoc.* – 1992. – Vol. 267. – P. 1244–1252.
210. *Christopher, L.* Metabolism and Disposition of a Selective  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist in Humans / L. Christopher, Sh.M. Gunduz, J.R. Scialis [et al.] // *Amer. Soc. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2007. – Vol. 35, №7. – P. 1188–1195.
211. *Coffa, G.* On the relationship of substrate orientation hydrogen abstraction and product stereochemistry in single and double dioxygenations by soybean lipoxygenase-1 and its Ala 542 Gly mutant / G. Coffa, A.N. Imber, B.C. Magnire Laxmi [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 38756–38766.
212. *Corey, E.J.* Conversion of arachidonic acid to the prostaglandin endoperoxide PGG<sub>2</sub> a chemical analog of the biosynthetic pathway / E.J. Corey, Z. Wang // *Tetrahedron Lett.* – 1994. – Vol. 35. – P. 539–542.
213. *Cunnane, S.C.* Substantial carbon recycling from linoleate into products of de novo lipogenesis occurs in rat liver even under conditions of extreme dietary deficiency / S.C. Cunnane, K. Betza, M.J. Anderson, M.A. Ryan // *J. Lipid Res.* – 1998. – Vol. 39. – P. 2271–2276.
214. *Cunnane, S.C.* The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat / S.C. Cunnane, M. J. Anderson // *J. Nutr.* – 1997. – Vol. 127. – P.146–152.
215. *Curvall, M.* Conjugation pathways in nicotine metabolism. Effects of nicotine on biological systems / M. Curvall, E. Kazemi-Vala, G. Englund. – Basel: Birkhäuser Basel, 1991. – P. 69–75.
216. *Cyrille, C.* Electrochemical Approach to the Mechanistic Study of Proton-Coupled Electron Transfer / C. Cyrille // *Chem. Rev.* – 2008. – Vol. 108. – P. 2145–2179.
217. *D'Souza, K.* Catalytic activity and acyl-chain selectivity of diacylglycerol kinase  $\epsilon$  are modulated by residues in and near the lipoxygenase-like motif / K. D'Souza, R.M. Epanand // *J. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 416, № 5. – P. 619–628.

218. *Dagne, E.* Cotinine-N-oxide a new metabolite of nicotine / E. Dagne, N.Jr. Castaguoli // *J. Ned. Chem.* – 1972. – Vol. 15, № 8. – P. 840–841. Doi:10.1021/jm00278a011
219. *Dajani, R.M.* Reduction in vivo of nicotine-1'-N-oxide by germ-free and conventional rats / R.M. Dajani, J.W. Gorrod, A.H. Beckett // *Biochem. Pharmacol.* – 1975. – Vol. 24. – P. 648–650.
220. *Dale, H.H.* The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine / H.H. Dale // *J. Pharmacol.* – 1914. – Vol. 61, № 2. – P. 147–190.
221. *Dannenberger, D.* High – fat diets rich in  $\omega$ -3 or  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids have distinct effects on lipid profiles and lipid peroxidation in mice selected for either high body weight or leanness / D. Dannenberger, G. Nuernberg, U. Rene [et al.] // *Nutrition.* – 2013. – Vol. 29, № 5. – P. 765–771.
222. *Das, M.* Role of Active Oxygen Species in the Photodestruction of Microsomal Cytochrome P-450 and Associated Monooxygenases by Hematoporphyrin Derivative in Rats / M. Das, R. Dixit, H. Mukhtar, D.R. Bickers // *Cancer Res.* – 1985. – Vol. 45, № 2. – P. 608–615.
223. *Dascal, N.* Involvement of a GTP-binding proteins in mediatory of serotonin and acetylcholine responses in *Xenopus* oocytes injected with rat brain messenger RNA / N. Dascal, C. Ifune, R. Hopkins [et al.] // *Mol. Brain Res.* – 1986. – Vol.1, № 3. – P. 201–209.
224. *De George, J.J.* Arecoline stimulated brain incorporation of intravenously administrated fatty acids in un anesthetized rats / J.J. De George, T. Nariai, S. Yamazaki [ et al.] // *J. Neurochem.* – 1991. – Vol. 56. – P. 352–355.
225. *De Vore, N.M.* Structural comparison of cytochromes P 450 2A6, 2A13, and 2E1 with pilocarpine / N.M. De Vore, K.M. Meneely, A.G. Bart [et al.] // *FEBS J.* – 2012. – Vol. 279, № 9. – P. 1621–1631.
226. *Deigner, H.P.* Oxidized phospholipid: emerging lipid mediators in pathophysiology / H.P. Deigner, A. Hermetter // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2008. – Vol.19, № 3. – P.289–294.
227. *Del Rio, D.* A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress / D. Del Rio, A.J. Stewart, N. Pellegrini // *Nutr. Metabolism Cardiovasc. Dis.* – 2005. – Vol.15. – P. 316–328.
228. *Denis, C.* Probing heterotrimeric G-protein activation: applications to biased ligands / C. Denis, A. Sanliere, S. Galandrin [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* – 2012. – Vol. 18, № 2. – P. 128–144.
229. *Deutsch, J.* Relation between free fatty acid and acyl-CoA concentration in rat brain following decapitation / J. Deutsch, S.I. Rapoport, A.D. Purdon // *Neurochem. Res.* – 1997. – Vol. 22. – P. 759–765.
230. *Di Paolo, G.* Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics / G. Di Paolo, P. De Camilli // *Nature.* – 2006. – Vol. 443. – P. 651–657.
231. *Djemel, H.* Oxygen Activation by Cytochrome P450 monooxygenase / H. Djemel, Z. Haoming, P. Hollenberg // *Photosynth. Res.* – 2008. – Vol. 98, № 1–3. – P. 657–666.

232. *Dohlman, H.G.* Models systems for the study of seven – transmembrane segment receptors / H.G. Dohlman, J. Thorner, M.G. Caron [et al.] // *Ann. Rev. Biochem.* – 1991. – Vol. 60. – P. 653–684.

233. *Domenichiello, A.F.* Whole body synthesis rates of DHA from  $\alpha$ -linolenic acid are greater than brain DHA accretion and uptake rates in adult rats / A.F. Domenichiello, C.T. Chen, M.O. Trepanier [et al.] // *J. Lipid Res.* – 2014. – Vol. 55, № 1. – P. 62–74.

234. *Dubinina, E.E.* Role of 4-hydroxy-trans-2-nonenal in cell function / E.E. Dubinina, V. A. Dadali // *Biochemistry. Biokhimia.* – 2010. – Vol. 75. – P. 1069–1087.

235. *Dunlap, M.E.* Muscarinic agonist and guanine nucleotide activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase in isolated islet – cell membranes / M.E. Dunlap, R.G. Larkins // *Biochem. J.* – 1986. – Vol. 240, № 3. – P. 731–737.

236. *Eaterbauer, H.* Biological interactions of alpha, beta-unsaturated aldehydes / H. Eaterbauer, G. Witz // *Free Radic. Biol. Med.* – 1997. – № 7. – P. 333–349.

237. *Epanand, R.M.* Recognition of polyunsaturated acyl chains by enzymes acting on membrane lipids / R.M. Epanand // *Biochimica et Biophysica (BBA) – Biomembranes.* – 2012. – Vol. 1818, № 4. – P. 957–962.

238. *Epstein, C.D.* Bedside Assessment of Tissue Oxygen Saturation Monitoring in Critically Ill Adults: An Integrative Review of the Literature / C.D. Epstein, K.T. Haghenbeck // *Crit. Care Res. Pract.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 683–709.

239. *Esterbauer, H.* Chemistry and biochemistry of 1,4 - hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes / H. Esterbauer, J. Gebicki, H. Puhl, G. Jörgens // *Free Radic. Biol. Med.* – 1991. – Vol. 11. – P. 81–128.

240. *Esterbauer, H.* The role of lipid peroxidation and antioxidations in oxidative modification of LDL / H. Esterbauer, J. Gebicki, H. Puhl // *Free Radic. Biol. Med.* – 1992. – Vol. 13. – P. 341–390.

241. *Farmer, E.H.* The course of autoxydation reactions in polyisoprenes and allied compounds. Rearrangement of double bonds during an autoxydation / E.H. Farmer, H.P. Koch, D.A. Sutton // *J. Chem. Soc.* – 1943. – № 7. – P. 541–546.

242. *Felder, C.C.* A transfected m5 muscarinic acetylcholine receptor stimulates phospholipase A2 by inducing both calcium influx and activation of protein kinase «C» / C.C. Felder, P. Dieter, J. Kinsella [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1990. – Vol. 255, № 3. – P. 1140–1147.

243. *Ferre, S.* The GPCRs Heterotetramer: Challenging Classical Pharmacology / S. Ferre // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2015. – Vol. 36, № 3. – P. 145–152.

244. *Fessel, J.P.* Discovery of lipid peroxidation products formed in vivo with a substituted tetrahydrofuran ring (isofurans) that are favored by increased oxygen tension / J.P. Fessel, N.A. Porter, K.P. Moore [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99. – P.16713–16718.

245. *Fleming, I.* Endothelium – derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrom P4502C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries / I. Fleming, V. R. Michaelis, D. Bredenkotter [ et al.] // *Circ. Res.* – 2001. – Vol. 88. – P. 44–51.
246. *Florio, V.A.* Reconstitution of resolved muscarinic cholinergic receptors with purified GTP– binding proteins / V.A. Florio, P.C. Steruweis // *J. Biol. Chem.* – 1985. – Vol. 260, № 6. – P.3477–3483.
247. *Folch, J.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley // *J. Biol. Chem.* – 1957. – Vol. 226. – P. 497–509.
248. *Fong, T.M.* Correlation between Acetylcholine receptor function and structural properties of membranes / T.M. Fong, M.G. McNamee // *Biochemistry.* – 1986. – Vol. 25. – P. 830–840.
249. *Forman, H.J.* Reactive oxygen species and alpha, beta–unsaturated aldehydes as second messengers in signal transduction / H.J. Forman // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2010. – Vol. 1203. – P.35–44.
250. *Frank, E.A.* Blood glucose determination: plasma or serum? / E.A. Frank, M.C. Shubha, C.J. DrSouza // *J. Clin. Lab. Anal.* – 2012. – Vol. 26, № 5. – P. 317–320. doi: 10.1002/jcia. 21524.
251. *Frey, R.S.* PKC-zeta regulates TNF- alpha induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells / R.S. Frey, A. Rahman, J.C. Kefer, R.D. Minshall [et al.] // *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 90, № 9. – P. 1012–1019.
252. *Fridovich, I.* Superoxide radical and superoxide dismutases / I. Fridovich // *Ann. Rev. Biochem.* – 1995. – Vol. 54. – P. 97–112.
253. *Fukuzawa, K.* Antioxidant effect of L - tocopherol incorporation into lecithin liposomes on ascorbic acid – Fe 2+ induced lipid peroxidation / K. Fukuzawa, H. Chida, A. Tokumura, H. Tsukatani // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1981. – Vol. 206. – P. 73–180.
254. *Fukuzumi, S.* Proton- coupled electron transfer of unsaturated fatty acids and mechanistic insight into lipoxygenase / S. Fukuzumi // *Helv. Chim. Acta.* – 2006. – Vol. 89. – P.2425–2440.
255. *Gantam, D.* Metabolic Roles of the M 3 Muscarinic Acetylcholine Receptor Studied with M3 Receptor Mutant Mice: A Review / D. Gantam, J. Jeon, J. Hua Li // *J. Recept. Signal Transduction.* – 2008. – Vol. 28, № 1–2. – P. 93–108.
256. *Gardner, H.W.* Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids / H.W. Gardner // *Free Radic. Biol. Med.* – 1989. – Vol. 7. – P. 65–86.
257. *Ghosh, M.* Properties of the group IV phospholipase A 2 family / M. Ghosh, D. Tucker, S. Burchett, C. Leslie // *Prog. Lipid Res.* – 2006. – Vol. 45. – P. 487–510.
258. *Gilbert, N.C.* The structure of human 5-lipoxygenase / N.C. Gilbert, S.G. Bartlett, M.T. Waight, D. B. [et al.] // *Science.* – 2011. – Vol. 331. – P. 217–219.

259. *Gilies, G.E.* Sex – dependent diversity in ventral tegmental dopaminergic neurons and developmental programming: A molecular, cellular and behavioral analysis / G.E. Gilies, K. Virdee, S. McArthur, J.W. Dalley // *Neuroscience*. – 2014. – № 5. – P.30–33.

260. *Goldstein, D.S.* Catecholamines 101 / D. S. Goldstein // *Clin. Auton. Res.* – 2010. – Vol. 20, № 6. – P. 331–352. doi:10.1007/s 10286-010-0065-7.

261. *Gorrod, J.W.* The metabolism of nicotine – delta - 1'(5')-iminium ion in vivo and in vitro / J. W. Gorrod, A. R. Hibberd // *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.* – 1982. – № 7. – P. 293–298.

262. *Cappellari, G.G.* Treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental menopause / G.G. Cappellari, P. Losurdo, S. Mazzuco [et al.] // *J. Nutr. Biochem.* – 2013. – Vol. 24, № 1. – P.371–379.

263. *Gouzález, B.* Induction, modification and accumulation of HSP 70s in the rat liver after acute exercise: early and late responses / B. Gouzález, R. Manso // *J. Physiol.* – 2004. – Vol. 556, № 2. – P. 369–385. doi: 10.1113/physiol.2003.058420.

264. *Sawyer, G.W.* A conserved motif in the Membrane Peroximal C-Terminal Tail of Human Muscarinic M1 Acetylcholine Receptors Affects Plasma Membrane Expression / G.W. Sawyer, F.J. Ehlert, C.A. Shults // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2010. – Vol. 332, № 1. – P. 76–86.

265. *Griendling, K.K.* Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells / K.K. Griendling, C.A. Minieri, J.D. Ollerenshaw, R.W. Alexander // *Circ. Res.* – 1994. – Vol. 74. – P. 1141–1148.

266. *Grimsrud, P.A.* Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes / P.A. Grimsrud, H. Xie, T.J. Grifftin, D.A. Bernlohr // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 21837–21841.

267. *Gu, X.* Oxidatively truncated docosahexaenoate phospholipids: Total synthesis, generation, and peptide adduction chemistry / X. Gu, M. Sun, B. Gugin [et al.] // *J. Org. Chem.* – 2003. – Vol. 68. – P. 3749–3761.

268. *Gu, Y.* The first characterization of free radicals formed from cellular COX-catalyzed peroxidation / Y. Gu, Y. Xu, B. Law, S. Y. Qian // *Free Radic. Biol. Med.* – 2012. – Vol. 35. – P. 917–938.

269. *Gudis, K.* The role of cyclooxygenase in gastric mucosal protection / K. Gudis, C. Sakamoto // *Dig. Dis. Sci.* – 2005. – Vol. 50, Suppl. 1. – P. 16–23.

270. *Guichardant, M.* Aldehydes from n-6 fatty acid peroxidation. Effects on aminophospholipids / M. Guichardant, N. Bernond-Hubac, B. Chantegrel [et al.] // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* – 2002. – Vol. 67. – P. 147–149.

271. *Gunes, T.* Influence of maternal nicotine exposure on neonatal rat oxidant rat oxidant – antioxidant system and effect of ascorbic acid supplementation / T. Gunes, E. Kokln, I. Gunes [et al.] // *Hum. Exp. Toxicol.* – 2008. – Vol. 27, №10. – P. 781–786.

272. *Guzmán, M.* Metabolism of trans fatty acids by hepatocytes / M. Guzmán, W. Klein, T. Gymez del Pulgar, M. Geelen // *Lipids.* – 1993. – Vol. 34, № 4. – P. 381–386.

273. *Haga, K.* Reconstitution of the muscarinic acetylcholine receptor. Guanine nucleotide – sensitive high affinity binding of agonist to purified muscarinic receptor reconstituted with GTP – binding proteins (Gi and Go) / K. Haga, T. Haga, A. Ichiyama // *J. Biol. Chem.* – 1986. – Vol. 260, № 22. – P. 10133–10140.

274. *Haga, T.* Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. Proceeding of the Japan Academy. Series B / T. Haga // *Phys. Biol. Sci.* – 2013. – Vol. 89, № 6. – P. 226–256.

275. *Halima, B.A.* Indicators of oxidative stress in weanling and pubertal rats following exposure to nicotine via milk / B.A. Halima, K. Sarra, R. Kais [et al.] // *Hum. Exp. Toxicol.* – 2010. – Vol. 29, № 6. – P. 489–496.

276. *Hammond, V.J.* Esterified eicosanoids: generation characterization and function / V.J. Hammond, J. B. O Donnell // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1818. – P. 2403–2412.

277. *Han, J.W.* Oxidative stress mediated autotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in human lung epithelial adenocarcinoma cell line / J.W. Han, S. Gurunathan, J.K. Jeonget [ et al.] // *Nanoscale Res. Lett.* – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 459.

278. *Hanson, M.A.* Crystal structure of a lipid G-protein-coupled receptor / M.A. Hanson, C.B. Roth, E. Jo, F.L. Scott [et al.] // *Science.* – 2012. – Vol. 335. – P. 851–855.

279. *Harbuz, M.S.* Stress and the hypothalamo – pituitary – adrenal axis: acute chronic and immunological activation / M.S. Harbuz, S.L. Lightman // *J. Endocrinol.* – 1992. – Vol. 134. – P. 327–339.

280. *Harley, D.P.* Prooxidant – initiated lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes: detection of 4-hydroxyl nonenal and malondialdehyde – protein adducts / D.P. Harley, D.J. Kroll, D.R. Petersen // *Chem. Res. Toxicol.* – 1997. – Vol. 10, № 8. – P. 895–905.

281. *Hata, A.N.* Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation / A.N. Hata, R.M. Breyer // *Pharmacol. Ther.* – 2004. – Vol. 103. – P. 147–166.

282. *Hedin, K.E.* Specificity of receptor G protein interactions: searching for the structure behind the signal / K.E. Hedin, K. Duerson, D.E. Clapham // *Cell Sig.* – 1993. – Vol. 5. – P. 505–518.

283. *Henderson, C.J.* Evidence that cytochrome b 5 reductase can act as sole electron donors to the hepatic cytochrome P450 system / C.J. Henderson, L.A. McLanghlin, C.R. Wolf // *Mol. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 83, № 6. – P. 1209–1217.

284. *Henderson, R.* Model of the structure of bacteriorhodopsin based on high – resolution electron cryo – microscopy / R. Henderson, J.M. Baldwin, T.A. Ceska [ et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1990. – Vol. 213. – P. 899–929.

285. *Holland, H.L.* Enzymatic hydroxylation reaction / H.L. Holland, H.K. Weber // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 11. – P. 547–556.

286. *Hossain, A.M.* Analytical determination of nicotine in tobacco levels by gas chromatography–mass spectrometry / A.M. Hossain, S.M. Salehuddin // Arab. J. Chem. – 2013. – Vol. 6, № 3. – P. 275–278.

287. *Hulme, E.C.* Muscarinic receptor subtypes / E.C. Hulme, N.J.M. Birdsall, N.J. Buckley // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1990. – Vol. 30. – P. 633–673.

288. *Irvine, R.F.* How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? / R.F. Irvine // Biochem. J. – 1982. – Vol. 206. – P. 3–16.

289. *Ivanov, I.* Molecular enzymology of lipooxygenases / I. Ivanov, D. Heydeck, L. Hofhenz [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 2010. – Vol. 503. – P. 161–174.

290. *Jacobs, A.T.* Systems analysis of protein modification and cellular responses induced by electrophile stress / A.T. Jacobs, L.J. Marnett // Acc. Chem. Res. – 2010. – Vol. 43. – P. 673–683.

291. *Jain, A.* Dose related effects of nicotine on oxidative injury in young, adult and old rats / A. Jain, S.J. Flora // J. Environ. Biol. Acad. Environ. Biol. (India). – 2012. – Vol. 33, № 2. – P. 233–238.

292. *Janero, D.R.* Malondialdehyde and thiobarbituric acid – reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury / D.R. Janero // Free Radic. Biol. Med. – 1990. – Vol. 9. – P. 515–540.

293. *Janmay, P.A.* Biophysical properties of lipids and dynamic membranes / P.A. Janmay, P.K.J. Kinnunen // Trends Cell Biol. – 2006. – Vol. 16, № 10. – P. 538–546.

294. *Jarerattanachat, V.* Molecular Dynamics study of oxidized lipid bilayer in NaCl solution / V. Jarerattanachat, M. Karttunynen, J. Wong-Ekkabut // J. Phys. Chem. B. – 2013. – Vol. 117. – P. 8490–8501.

295. *Jenkins, C.M.* Identification of the calmodulin-binding domain of recombinant calcium-independent phospholipase A 2 beta implications for structure and function / C.M. Jenkins, M.J. Wolf, D.J. Mancuso, R.W. Gross // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 7129–7135.

296. *Johnston, J.B.* Structural control of cytochrome P-450 – catalyzed  $\omega$  – hydroxylation / J.B. Johnston, H. Onellet, L.M. Podust, P.R. Ortiz de Montellano // Arch. Biochem. Biophys. – 2011. – Vol. 507, № 1. – P. 86–94.

297. *Jones, C.R.* Evidence for the involvement of docosahexaenoic acid in cholinergic stimulated signal transduction at the synapse / C.R. Jones, T. Arai, S.I. Rapoport // Neurochem. Res. – 1997. – Vol. 22. – P. 663–670.

298. *Jones, C.R.* Preferential in vivo incorporation of [3H] arachidonic acid from blood into rat brain synaptosomal fractions before and after cholinergic stimulation / C.R. Jones, T. Arai, J.M. Bell, S. Rapoport // J. Neurochem. – 1996. – Vol. 67. – P. 822–829.

299. *Joo, Y.-C.* Lipoxygenases: Potential starting biocatalysts for the synthesis of signaling compounds / Y.-C. Joo, D.-K. Oh // Biotechnol. Adv. – 2012. – Vol. 30, № 6. – P. 1524–1532.

300. *Jordan, R.A.* Relationship between malondialdehyde consumption during NADF • H supported microsomal lipid peroxidation / R.A. Jordan, J.B. Schenkman // *Biochem. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 31, № 7. – P. 1393–1400.
301. *Joshi, N.* Kinetic and structural investigation into the allosteric and pH effect on the substrate specificity of human epithelial 15-lipoxygenase-2 / N. Joshi, E.K. Hoobler, S. Perry [ et al.] // *Biochemistry.* – 2013. – Vol. 52, № 45. – P. 8026–8035.
302. *Jürgen, W.* Molecular mechanisms of muscarinic acetylcholine receptor function / W. Jürgen. – Heidelberg: Springer Verlag, Germany, 1995. – 272 p.
303. *Kalpana, C.* Comparative effects of curcumin and its synthetic analogue on tissue lipid peroxidation on and antioxidant status during nicotine – induced toxicity / C. Kalpana, A.R. Sudheer, K.N. Rajasekharan, V. P. Menon // *Singapore Med. J.* – 2007. – Vol. 48, № 2. – P. 124–130.
304. *Kamata, K.* Effects of superoxide dismutase on the acetylcholine–induced relaxation response in cholesterol–fed and streptozotocin–induced diabetic mice / K. Kamata, M. Nakajima, M. Sugiura // *J. Smooth Muscle Res.* – 1999. – Vol. 35, № 2. – P. 33–46.
305. *Kanoh, H.* Pertussis toxin–insensitive G protein mediates carbachol activation of phospholipase D in rat pheochromocytoma PC 12 cells / H. Kanoh, Y. Kanaho, Y. Nozawa // *J. Neurochem.* – 1992. – Vol. 59. – P.1786–1794.
306. *Kao, P.* Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross link between adjacent half – cystinyl residues / P. Kao, A. Karlin // *J. Biol. Chem.* – 1986. – Vol. 261. – P. 8085–8088.
307. *Karlin, A.* Toward a structural basis for the function on of nicotinic acetylcholine receptors and their consins / A. Karlin, M. Akabas // *Neuron.* – 1995. – Vol. 15. – P. 1231–1244.
308. *Kates, M.* Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids / M. Kates. – New York; Oxford: Elsevier, 1986. – 465 p.
309. *Kehrer, J.P.* The molecular effect of acrolein / J.P. Kehrer, S.S. Biswal // *Toxicol. Sci.* – 2000. – Vol. 57. – P.6–15.
310. *Kendall, A.C.* Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity / A.C. Kendall, A. Nicolau // *Prog. Lipid Res.* – 2013. – Vol. 52, № 1. – P. 141–164.
311. *Knapp, M.J.* Kinetic studies of oxygen reactivity in soybean lipoxygenase-1 / M.J. Knapp, J.P. Klinman // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42. – P. 11466–11476.
312. *Knight, J.A.* Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation / J.A. Knight, R.K. Pieper, L. McClellon // *Clin. Chem.* – 1988. – Vol. 34. – P. 2433–2438.
313. *Koppenol, W.H.* Oxygen activation by cytochrome P450: a thermodynamic analysis / W.H. Koppenol // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – Vol. 129, № 3. – P. 9686–9690.

314. *Kovaleva, E.G.* Finding intermediates in the O<sub>2</sub> activation pathways of non – heme iron oxygenases / E.G. Kovaleva, M.B. Neibergall, S. Chakrabarty, J.D. Lipscomb // *Acc. Chem. Res.* – 2007. – Vol. 40, № 7. – P. 475–483.

315. *Kühn, H.* How to lipoxygenases control the stereochemistry of fatty acid oxygenation? / H. Kühn, K. Schwarz, S. Borngräber, R.J. Kuban // *Int. Congr. Series.* – 2002. – Vol. 1233. – P. 291–296.

316. *Kuhnt, K.* Trans- fatty acid isomers and the trans–9/ trans–11 index in fat containing foods / K. Kuhnt, M. Baehr, C. M. Rohrer, G. Jahreis // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* – 2011. – Vol. 113, № 10. – P. 1281–1292.

317. *Kukreja, R.C.* PGH - synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH / R.C. Kukreja, H.A. Kontes, M.L. Hess, E.F. Ellis // *Circ. Res.* – 1986. – Vol. 59. – P. 612–619.

318. *Kulmacz, R.J.* Regulation of cyclooxygenase catalysis by hydroperoxides / R.J. Kulmacz // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 338. – P. 25–33.

319. *Kwetnansky, R.* Stress stimulates production of catecholamines in rat adipocytes / R. Kwetnansky, J. Ukropec, M. Laukova [et al.] // *Cell Mol. Neurobiol.* – 2012. – Vol. 32, № 5. – P. 801–813. doi: 10.1007/s10571-012-9822-6.

320. *Laszlo, Gyermek.* Pharmacology of antimuscarinic agents / Gyermek Laszlo. – London: CRS Press LLC, 1997. – 528 p.

321. *Li, M.* Up-expression of cold-sensitive receptor and its clinical significance in patients with chronic obstructive pulmonary disease / M. Li, N. Li, J.M. Perelman, V.P. Kolosov [ et al.] // *Basic Clin. Med.* – 2014. – Vol. 34, №11. doi: R562.

322. *Liavonchanka, A.* Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis / A. Liavonchanka, I. Feussner // *J. Plant Physiol.* – 2006. – Vol. 163. – P. 348–357.

323. Lin, B. 12(S) – HETE Enhancement of Prostate tumor cell invasion: selective Role of PKC b / B. Lin, R.J. Maher, Y.A. Hanuun [et al.] // *Cancer Inst.* – 1994. – Vol.86. – P. 1145–1150.

324. *Lin, B.* 12(S) hydroxyeicosatetraenoic acid and 13 (S) hydroxyoctadecadienoic acid regulation of protein kinase C – alpha in melanoma cells: role of receptor mediated hydrolysis of inositol phospholipids / B. Lin, W.A. Khan, Y.A. Haunun [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1995. – Vol.92. – P. 9323–9327.

325. *Lin, R.* Fatty acid binding proteins in brain development and disease / R. Lin, Z. Mita, R. Beaulien [ et al.] // *J. Dev. Biol.* – 2010. – Vol. 54. – P. 1229–1239.

326. *Lipsky, P.E.* Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease / P.E. Lipsky, P. Brooks, L.J. Crofford [et al.] // *Arch. Intern. Med.* – 2000. – Vol. 160. – P. 913–920.

327. *Liscovitch, M.* Calcium inhibits guanine nucleotide – activated phospholipase «D» in neural – derived №6108-6115 cells / M. Liscovitch, Y. Eli // *Cell Regul.* – 1991. – Vol. 2. – P. 1011–1019.

328. *Liu, B.* Functional control of cold and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate / B. Liu, F. Qin // *J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 25. – P. 1674–1681.
329. *Liu, D.* Intracellular Ca<sup>2+</sup> and the phospholipid PIP 2 regulate the taste transduction ion channel TRPM5 / D. Liu, E. R. Liman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100. – P. 15160–15165.
330. *Liu, J.* Prostaglandin endoperoxide H synthases: peroxidase hydroperoxide specificity and cyclooxygenase activation / J. Liu, S. A. Seibold, C. J. Rieke [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282. – P. 18233–18244.
331. *Loh, H.* Molecular evolution of enzymes involved in the arachidonic acid cascade / H. Loh, Y. Urade, T. Tansbe // *Mediat. Inflamm.* – 1992. – Vol. 1. – P. 223–233.
332. *Long, E.K.* High fat diet induces changes in adipose tissue trans – 4- oxo – nonenal and trans-4-hydroxy-2-nonenal levels in a depot-specific manner / E.K. Long, D.M. Olson, D.A. Bernlohr // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. – Vol. 63. – P. 390–398.
333. *Long, E.K.* Trans-4-hydroxyl-2-hexenal, a product of n-3 acid peroxidation: make some room HNE ••• / E.K. Long, M.J.Sr. Picklo // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 49, № 1. – P.1–8.
334. *Lubos, E.* Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis / E. Lubos, D.E. Handy, J. Loscalzo // *Front. Biosci.* – 2008. – Vol. 13. – P. 5223–5344.
335. *Lucas, D.* Stereoselective epoxidation of the last double bond of polyunsaturated fatty acids by human cytochromes P450 / D. Lucas, S. Goulitquer, J. Marienkagen [ et al.] // *J. Lipid Res.* – 2010. – Vol. 51, № 5. – P. 1125–1133.
336. *Maeshima, T.* Quantitative analysis of acrolein – specific adducts generated during lipid peroxidation modification of proteins in vitro: identification of N(T) – (3-propanal) histidine as the major adduct / T. Maeshima, K. Honda, M. Chikazawa [et al.] // *Chem. Res. Toxicol.* – 2012. – Vol. 25. – P. 1384–1392.
337. *Mahapatra, S.K.* In vitro nicotine – induced oxidative stress in mice peritoneal macrophages: a dose–dependent approach / S.K. Mahapatra, S. Das, S. Bhattacharjee [ et al.] // *Toxicol. Mechanisms Meth.* – 2009. – Vol. 19, № 2. – P. 100–108.
338. *Maillard, B.* Rate constants for the reactions of free radicals with oxygen in solution / B. Maillard, K.V. Ingold, J.C. Scaiano // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1983. – Vol. 105. – P. 5095–5099.
339. *Mak, P.J.* Resonance Raman detection of the hydroperoxo intermediate in the cytochrome P450 enzymatic cycle / P.J. Mak, I.G. Denisov, D. Victoria [ et al.] // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2007. – Vol. 129, № 20. – P. 6382–6383.
340. *Mancuso, D.J.* Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> {gamma} leads to alterations in hippocampal cardiolipin content and molecular species distribution, mitochondrial degeneration, autophagy and cognitive dysfunction / D.J. Mancuso, P. Kotzbauer, D.F. Wozniak [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 35632–35644.

341. *Maritz, G.S.* Nicotine and lung development / G. S. Maritz // *Embryo Today: Reviews.* – 2008. – Vol. 84, № 1. – P. 45–53.

342. *Marnett, L.J.* Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition / L.J. Marnett, S.W. Rowlinson, D.C. Goodwin [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, № 33. – P. 22903–22906.

343. *Marnett, L.J.* Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde / L.J. Marnett // *Mutat. Res.* – 1999. – Vol. 424. – P. 83–95.

344. *Marnett, L.J.* Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion / L.J. Marnett // *Carcinogenesis.* – 1987. – Vol. 8. – P. 1365–1379.

345. *Massey, K.* Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids / K. Massey, A. Nicolaou // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. – Vol. 59. – P. 45–55.

346. *Mbonye, U.R.* Two distinct pathways for cyclooxygenase - 2 protein degradation / U.R. Mbonye, C. Yuan, C.E. Harris [et al.] // *Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 8611–8623.

347. *McAdam, B.F.* Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation / B.F. McAdam, I.A. Mardini, A. Habib [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2000. – Vol. 105. – P. 1473–482.

348. *McKenney, D.D.* Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation / D.D. McKenney, W.M. Neuhasser, D. Julius // *Nature.* – 2002. – Vol. 416. – P. 52–58.

349. *McKenney, D.D.* The molecular and cellular basis of cold sensation / D.D. McKenney // *ACS Chem. Neurosci.* – 2013. – Vol. 4, № 2. – P. 238–247.

350. *McKennis, H.Jr.* N-methylation of nicotine and cotinine in vivo / H.Jr. McKennis, L.B. Turnbull, E.R. Bowman // *J. Biol. Chem.* – 1962. – Vol. 238. – P. 719–723.

351. *McLanghlin, L.A.* Deletion of microsomal cytochrome b5 profoundly affects hepatic and extrahepatic drug metabolism / L.A. McLanghlin, S. Ronseaux, R.D. Finn [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 78, № 2. – P. 269–279.

352. *McMahon, H.T.* Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling / H.T. McMahon, J. L. Gallop // *Nature.* – 2005. – Vol. 438. – P. 590–596.

353. *Meinhardt, S.* Monolayer curvature stabilizes nanoscale raft domains in mixed lipid bilayers / S. Meinhardt, R.L.C. Vink, F. Schmid // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110, № 12. – P. 4476–4481. Doi: 10.1073/pnas.1221075110.

354. *Menashian, A.* The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction / A. Menashian, G. B. Bulkley // *Microcirculation.* – 2002. – Vol. 9, №3. – P. 161–175.

355. *Meyer, E.M.* Effects of membrane peroxidation on [ 3H] acetylcholine release in rat cerebral cortical synaptosomes / E.M. Meyer, J.H. Judkins // *Neurochem. Res.* – 1993. – Vol. 18, № 10. – P. 1047–1050.

356. Meyer, M.C. Calcium-independent phospholipase A2 is regulated by a novel protein kinase C in human coronary artery endothelial cells / M.C. Meyer, P.J. Kell, M.H. Creer, J. McHowat // Amer. J. Physiol. Cell Physiol. – 2005. – Vol. 288. – P. 475–482.
357. Milatovic, D. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress / D. Milatovic, R.C. Gupta, M. Aschner // Sci. Violred J. – 2006. – Vol.60. – P. 295–310.
358. Milne, G.L. Identification of the major urinary metabolite of the highly reactive cyclopentenone isoprostane 15-A(2F) – isoprostane in vivo / G.L. Milne, L. Gao, A. Porta [et al.] // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280. – P. 25178–25184.
359. Minotti, G. Redox cycling of iron and lipid peroxidation / G. Minotti, S.D. Aust // Lipids. – 1992. – Vol. 27, № 3. – P. 219–226.
360. Mizhorkova, Z. Changes in [3H] Acetylcholine release from guinea pig ileum under condition of oxidative stress in vitro / Z. Mizhorkova, V. Kuneva, M. Kaneva, E. Milusheva // Comp. Renolus de LaAcad. Bulgare des Sci. – 2006. – Vol. 59, № 12. – P. 1303–1306.
361. Moberg, G.P. The Biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare / G.P. Moberg, J.A. Mench // CABI publishing, NY. – 2000. – № 1. – P. 22.
362. Mooradian, A.D. Malondialdehyde modification of proteins in vitro is enhanced in the presence of acetaldehyde / A.D. Mooradian, D. Reinacher, J.P. Li, J.L. Pinnas // Nutrition. – 2001. – Vol. 17. – P. 619–622.
363. Moretto, N. Acrolein effects in pulmonary cells: relevance to chronic obstructive pulmonary disease / N. Moretto, G. Volpi, F. Pastore [et al.] // Science. 2012. – Vol. 1259. – P. 39–46.
364. Morrison, A.R. Metabolism of arachidonic acid through NADPH • H – dependent oxygenase of renal cortex / A.R. Morrison, N. Pascoe // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1981. – Vol. 78. – P. 7375–7378.
365. Moss, C.W. Determination of cellular fatty acid compositions of various yeasts by gas-liquid chromatography / C.W. Moss, T. Shinoda, J.W. Samuels // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 16, № 6. – P. 1073–1079.
366. Mukherjee, A. Molecular oxygen dependent steps in fatty acid oxidation by cyclooxygenase-2 / A. Mukherjee, D.W. Brinkly, K.M. Chang, J.P. Roth // Biochemistry. – 2007. – Vol. 46, № 13. – P. 3975–3989.
367. Murakami, M. Prostaglandin E synthase: a novel drug target for inflammation and cancer / M. Murakami, I. Kudo // Curr. Pharm. Des. – 2006. – Vol. 12, № 8. – P. 943–954.
368. Murphy, P.J. Enzymatic oxidation of nicotine to nicotine- $\Delta 1'$ , 5'-iminium ion / P.J. Murphy // J. Biol. Chem. – 1973. – Vol. 248. – P. 2796–2800.
369. Murphy, R.C. Free – radical – induced oxidation of arachidonoyl plasmalogen phospholipids: antioxidant mechanism and precursor pathway for bioactive eicosanoids / R.C. Murphy // Chem. Res. Toxicol. – 2001. – Vol. 14, № 5. – P. 463–472.

370. *Myher, J.J.* Resolution of diacylglycerol moieties of natural glycerophospholipids by gas – liquid chromatography on polar capillary columns / J.J. Myher, A. Kuksis // *Can. J. Biochem.* – 2008. – Vol. 60, № 2. – P. 638–650.
371. *Nam, T.G.* Tetrahydro-1,8 naphthyridinol analogues of alpha-tocopherol antioxidants in lipid membranes and low-density lipoproteins / T. G. Nam, C. L. Rector, H.Y. Kim [et al.] // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2007. – Vol. 129, № 33. – P. 10211–10219.
372. *Nam, Tae-gyn.* Lipid peroxidation and its toxicological implications / Tae-gyn Nam // *Toxicol. Res.* – 2011. – Vol. 27, № 1. – P. 1–6.
373. *Nariai, T.* Differences in rates of incorporation of intravenously injected radiolabeled fatty acids into phospholipids of intra cerebrally implanted tumor and brain in awake rats / T. Nariai, J.J. DeGeorge, N. H. Greig [et al.] // *Clin. Exp. Metastasis.* – 1994. – №12. – P. 213–225.
374. *Neau, D.B.* The structure of Human 5-Lipoxygenases / N.C. Gilbert, G.B. Sue, M.T. Waight, D.B. Neau // *Science.* – 2010. – Vol. 331, № 6014. – P. 217–219.
375. *Ned, A.* Perspective on Free radical Autooxidation: The Physical Organic Chemistry of polyunsaturated fatty acid and sterol peroxidation / A. Ned, A. Porter // *J. Org. Chem.* 2013. – Vol. 78, №8. – P. 3511–3524.
376. *Negre-Salvayre, A.* Pathological aspect of lipid peroxidation / A. Negre – Salvayre, N. Auge, V. Ayala [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2010. – Vol. 44. – P. 1125–1171.
377. *Neuronal Nicotinic Receptors: pharmacology and therapeutic opportunities* / Edited by P. Stephen. – New York: Wiley-Liss, 1999. – 421 p.
378. *Neve, E.P.* Cytochrome P 450 proteins: retention and distribution from the endoplasmic reticulum / E.P. Neve, I.M. Sundberg // *Curr. Opin Drug Discov. Devel.* – 2010. – Vol. 13, № 1. – P. 78–85.
379. *Newman, Sh.J.* Impact of circulating esterified eicosanoids and other oxylipins on endothelial function / Sh.J. Newman // *Curr. Atheroscler. Rep.* – 2009. – Vol. 11. – P. 403–410.
380. *Nicolau, A.* Polyunsaturated Fatty Acid – Derived Lipid Mediators and T Cell Function / A. Nicolau, C. Mauro, P. Urquhart, F. Mazelli-Berg // *Front. Immunol.* – 2014. – № 5. – P. 75.
381. *Nie, D.* Eicosanoid regulation on of angiogenesis: role of endothelial arachi – donate 12- lipoxygenase / D. Nie, K. Tang, C. Diglio, K.V. Honn // *Blood.* – 2000. – Vol. 95. – P. 705–716.
382. *Nigam, S.* Structure biochemistry and biology of hepoxillins: an update / S. Nigam, M.P. Zafirion, R. Deva [et al.] // *FEBS J.* – 2007. – Vol. 274, №14. – P. 3503–3512.
383. *Nigam, S.* Phospholipase A (2) and lipid peroxidation / S. Nigam, T. Schewe // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1488. – P. 167–181.
384. *Nourdot, B.E.* The emerging role of oxylipins in thrombosis and diabetes / B. E. Nourdot, I. Ahmed, M. Holinstat // *Front. Pharmacol.* – 2014. – № 4 – P. 716.

385. *Nowell, P.T.* Hydrolysis of neostigmine by plasma cholinesterase / P.T. Nowell, C.A. Scott, A. Wilson // *Br. J. Pharmacol. Chemother.* – 1962. – Vol. 19, № 3. – P. 498–502.
386. *Nutrition and metabolism in the surgical patient* / edited by Y. E. Fisher. Second edition. – Boston; New York; Toronto; London: Little, Brown and Company, 1996. – 831 p.
387. *O'Connor, D.E.* Stereochemical course of the autoxidative cyclization of lipid hydroperoxides to prostaglandins – like bicycle endoperoxides / D.E. O'Connor, E.D. Mihelich, M.C. Coleman // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1984. – Vol. 106. – P. 3577–3584.
388. *Offenbacher, A.R.* Redox-linked conformational control of proton – coupled electron transfer: Y 122 in the ribonucleotide reductase  $\alpha 2$  subunit / A.R. Offenbacher, L.A. Burus, C.D. Sherrill, B. A. Barry // *J. Phys. Chem. B.* – 2013. – Vol. 117, № 28. – P. 8457–8468. doi 10.1021/p.404757r.
389. *Offermanns, S.* Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to Gi- type G protein and Gq / 11 / S. Offermanns, T. Wieland, D. Homann [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 1994. – Vol. 45. – P. 890–898.
390. *Oldham, M.L.* Insights from the X-ray Crystal structure of Coral 8R-Lipoxygenase / M.L. Oldham, A.R. Brash, M.E. Newcomer // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 39545–39552.
392. *Oliw, E.H.* Bis – allylic hydroxylation of polyunsaturated fatty acids by hepatic monooxygenases and its relation to the enzymatic and nonenzymatic formation of conjugated hydroxyl fatty acids / E.H. Oliw, D. Brodowsky, L. Hênstein, M. Hamberg // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1993. – Vol. 300. – P. 434–439.
393. *Oliw, E.H.* Oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P-450 monooxygenases / E.H. Oliw // *Proc. Lipid Res.* – 1994. – Vol. 33. – P. 329–354.
394. *Özyurt, H.* Investigation into the role of the cholinergic system in radiation induced damage in the rat liver and ileum / H. Özyurt, A.S. Özden, Ö. Cevlk [et al.] // *J. Radiat. Res.* 2014. – Vol. 55, № 5. – P. 866–875.
395. *Palinski, W.* ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation – specific epitopes in lesion and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum / W. Palinski, V.A. Ord, A.S. Plump, J.L. Breslow [et al.] // *Arterioscler. Tromb.* – 1994. – Vol. 14. – P. 605–615.
396. *Papke, R.L.* Activation and Inhibition of Mouse Muscle and Neuronal Nicotinic Acetylcholine receptors Expressed in *Xenopus* Oocytes / R.L. Papke, L. Wecker, J.A. Stitzel // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2010. – Vol. 333, № 2. – P. 501–518.
397. *Parker, E.M.* Reconstitutively active G protein – coupled receptors purified from baculovirus – infected insect cells / E.M. Parker, K. Kameyama, T. Higashijima [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266. – P. 519–527.

398. *Patel, M.* Seizure-induced formation of isofurans: novel products of lipid peroxidation whose formation is positively modulated by oxygen tension / M. Patel, L. P. Liang, H. Hou, B.B. Williams // *J. Neurochem.* – 2008. – Vol. 104. – P. 264–270.

399. *Pekarova, M.* Mutagenesis of triad determination of rat Alox 15 alters the specificity of fatty acid and phospholipid oxygenation / M. Pekarova, H. Kuhn, L. Bezakova [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2015. – Vol. 571. – P. 50–57. doi.10.1016/j.abb.2015/02/029. Epub 2015 Feb 27

400. *Perez, Ch.G.* Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A<sub>2</sub> and lysophospholipid acyltransferases / Ch.G. Perez, A.M. Astudillo, D. Balgoma [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1791. – P. 1103–1113. Doi: 10.1016/j.bbali. 2009. 08.007

401. *Petrovskii, A.L.* Gas chromatographic method of determining the fatty acid composition of phospholipids / A.L. Petrovskii, L.B. Sugak, L.L. Tkacheva // *Lab. Delo.* – 1982. – № 9. – P. 573–574.

402. *Pier, A.M.* A TRP channel that senses cold stimuli and menthol / A.M. Pier, A. Moqrich, A.C. Hergarden [et al.] // *Cell.* – 2002. – Vol.108. – P. 705-715.

403. *Pittman, R.N.* Oxygen transport in the microcirculation and its regulation / R. N. Pittman // *Microcirculation.* – 2013. – Vol. 20, № 2. – P. 117–137.

404. *Poli, G.* Liver damage due to free radicals / G. Poli // *Brit. Med. Bull.* – 1993. – Vol. 49, №3. – P. 604–620.

405. *Pool, W.F.* Nicotine racemization during cigarette smoking / W.F. Pool, C.S. Godin, P.A. Crooks // *Toxicologist.* – 1985. – № 3. – P. 232.

406. *Porter, N.A.* Autoxidation of polyunsaturated lipids. Factors controlling the stereochemistry of product hydroperoxides / N.A. Porter, B.A. Weber, H. Weenen, J.A. Khan // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1980. – Vol. 102. – P. 5597–5601.

407. *Porter, N.A.* Mechanisms of free radicals oxidation of unsaturated lipids / N.A. Porter, S. Calldwell, K.A. Mills // *Lipids.* – 1995. – Vol. 30. – P. 277–290.

408. *Porter, N.A.* Unified mechanism for polyunsaturated fatty acid autoxidation. Competition of peroxy radical hydrogen atom abstraction,  $\beta$  – scission, and cyclization / N.A. Porter, L.S. Lehman, B.A. Weber [et al.] // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1981. – Vol. 103. – P. 6447–6451.

409. *Prabhune, A.* Transformation of arachidonic acid to 19-hydroxy and 20-hydroxy – eicosatetraenoic acid using *Candida bombicola* / A. Prabhune, S.R. Fox, C. Ratledge // *Biotechnol. Lett.* – 2002. – Vol. 24. – P. 1041–1044.

410. *Pratt, D.A.* Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: New mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks / D.A. Pratt, K.A. Tallman, N.A. Porter // *Account Clin. Res.* – 2011. – Vol.44, № 6. – P. 458–467.

411. *Pratt, D.A.* Theoretical calculation of carbon – oxygen bond dissociation enthalpies of peroxy radicals formed in the autoxidation of lipids / D.A. Pratt, J.H. Mill, N.A. Porter // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2003. – Vol. 125. – P. 5801–5810.

412. *Probst, W.C.* Sequence alignment of the G protein coupled receptor superfamily / W.C. Probst, L.A. Snyder, D.I. Schuster [et al.] // *DNA Cell Biol.* – 1992. – Vol. 11. – P. 1–20.
413. *Profita, M.* Acetylcholine leads to signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1) mediated oxidative stress in human bronchial epithelial cell line / M. Profita, G. Daniela, A.A.M. Montabano [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* – 2013. – Vol. 1832, № 42. – P. 1949–1958.
414. *Qian, S.Y.* Identification of all classes of spin - trapped carbon - centered radicals in soybean lipoxygenase - dependent lipid peroxidation of omega - 6 polyunsaturated fatty acids via LC / ESR, LC / MS, and tandem MS / S.Y. Qian, G.H. Yue, K.B. Tomer, R.P. Mason // *Free Radic. Biol. Med.* – 2003. – Vol. 34, № 8. – P. 1017–1028.
415. *Qiao, D.* Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos / D. Qiao, F.J. Seidler, Th.A. Slotkin // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 206, № 1. – P. 17–26.
416. *Radermacher, P.* Method for the gas chromatographic determination of long and medium chain free fatty acids in serum / P. Radermacher, H. Grote, F. Susanto, H. A. Reinaner // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* – 2008. – Vol. 20, №11. – P. 813–815.
417. *Ramires, M.T.* Cardiac muscarinic cholinergic receptor signaling: Phospholipase C activation, kinase cascades, and gene expression / M.T. Ramires, J. Brown // *Molecular mechanisms of muscarinic acetylcholine receptor function* / Edited by J. Wess. – Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. – P. 91–102.
418. *Rapoport, S.I.* Delivery and turnover of plasma - derived essential PUFAs in mammalian brain / S.I. Rapoport, M.C. Chang, A.A. Spector // *J. Lipid Res.* – 2001. – Vol. 42. – P. 678–685.
419. *Reed, K.* Functional characterization of mutations in inherited human c PLA 2 deficiency / K. Reed, D. Tucker, A. Alonlon [et al.] // *Biochemistry.* – 2011. – Vol. 50. – P. 1731–1738.
420. *Refsgaard, H.H.* Modification of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products / H.H. Refsgaard, L. Tsail, E.R. Stadtman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 611–616.
421. *Reid, G.* A cold- and menthol- activated current in rat dorsal root ganglion neurons: properties and role in cold transduction / G. Reid, A. Babes, F. Pluteann // *J. Physiol.* – 2002. – Vol. 416. – P. 52–58.
422. *Ritter, M.M.* Trans-fatty acids and lipids / M. M. Ritter, W. O. Richter // *Fortschr. der Medizin.* – 1992. – Vol. 110, № 2. – P. 205–207.
423. *Rizzo, M.T.* Cyclooxygenase - 2 in oncogenesis / M. T. Rizzo // *Clin. Chim. Acta.* – 2010. – Vol. 412. – P. 671–687.
424. *Roberts 2nd, L.G.* *Isoprostane* / L.G. Roberts 2nd, G.L. Milne // *J. Lipids Res.* – 2009. – P. 219–223.
425. *Roberts, L.J.* The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane and isofuran pathways of lipid peroxidation / L.J. Roberts, J.P. Fessel // *Chem. Phys. Lipids.* – 2004. – Vol. 128. – P. 173–186.

426. *Roschek, B.Jr.* Peroxyl radical clocks / B.Jr. Roschek, K.A. Tallman, C.L. Rector [et al.] // *J. Org. Chem.* – 2006. – Vol. 71. – P. 3527–3532.

427. *Rouzer, C.A.* Structural and functional differences between cyclooxygenases with a critical role in cell signaling / C.A. Rouzer, L.J. Marnett // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 338. – P. 34–44.

428. *Rouzer, C.A.* Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases / C.A. Rouzer, L.J. Marnett // *Chem. Rev.* – 2003. – Vol. 103. – P. 2239–2304.

429. *Rubio-Rodriguez, N.* Production of omega-3 polyunsaturated fatty acids concentrates: A review / N. Rubio-Rodriguez, S.R. Beltran, I. Jaime [et al.] // *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* – 2010. – Vol. 11. – P. 1–12.

430. *Rui, L.* Energy Metabolism in the Liver / L. Rui // *Comp. Physiol.* – 2014. – Vol. 4, № 1. – P. 177–197. doi: 10.1002/cphy.c.130024

431. *Sabatini, K.* Characterization of two oxidatively modified phospholipids in mixed monolayers with DPPG / K. Sabatini, J.P. Mattila, F.M. Megli, P.K. Kinunen // *Biophys. J.* – 2006. – Vol. 90. – P. 4488–4499.

432. *Sahin, E.* Stress – dependent induction of protein oxidation lipid peroxidation and anti - oxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization – cold) / E. Sahin, S. Gümüşlü // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2007. – Vol. 34, № 5–6. – P. 425–431.

433. *Salomon, R.G.* Isolevuglandins – protein adducts in humans: products of free radical induced lipid oxidation through the isoprostane pathways / R.G. Salomon, E. Batyрева, K. Kaur, D. L Sprecher [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1485. – P. 225–235.

434. *Salomon, R.G.* Isolevuglandins, oxidatively truncated phospholipids and atherosclerosis / R.G. Salomon // *Ann. NY. Acad. Sci.* – 2005. – Vol. 1043. – P. 327–342.

435. *Sancher, A.M.* Formation of inter – and intrastrand imine type DNA. DNA cross-link through secondary reactions of aldehyde adducts / A.M. Sancher I.D. Kozekov, T. M. Harris, R. S. Lloyd // *Chem. Res. Toxicol.* – 2005. – Vol. 18. – P. 1683–1690.

436. *Sandman, J.* Coupling of transfected muscarinic acetylcholine receptor subtype to phospholipase «D» / J. Sandman, E. G. Peralta, P. J. Wurtman // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol. 266. – P. 6031–6034.

437. *Santos, D.* The inhibitory effect of manganese on acetylcholinesterase activity enhances oxidative stress and neuroinflammation in the rat brain / D. Santos, D. Milatovic, V. Andrade [et al.] // *Toxicology.* – 2012. – Vol. 292, №2–3. – P. 90–98.

438. *Sasaguri, T.* Guanine nucleotide binding protein involved in muscarinic responses in the guinea pig coronary artery is insensitive to islet – activating protein / T. Sasaguri, M. Hirata, T. Iton [et al.] // *Biochem. J.* – 1986. – Vol. 239, № 3. – P. 567–574.

439. *Sawyer, G.W.* A conserved motif in the Membrane Peroximal C-Terminal Tail of Human Muscarinic M1 Acetylcholine Receptors Affects Plasma Membrane Expression / G.W. Sawyer, F.J. Ehlert, C.A. Shults // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2010. – Vol. 332, № 1. – P.76–86.
440. *Schllrenther, K.U.* Hydrogen peroxide regulates the cholinergic signal in a concentration dependent manner / K.U. Schllrenther, S. Elwary // *Life Sci.* – 2007. – Vol. 80, № 24. – P. 2221–2226.
441. *Schmeltz, J.* Nitrogen containing compounds in tobacco and tobacco smoke / J. Schmeltz, D. Hoffmann // *Chem. Rev.* – 1977. – Vol. 77. – P. 295–311.
442. *Schnaider, C.* An update on products and mechanisms of lipid peroxidation / C. Schnaider // *Mol. Nutrit. Food Res.* – 2009. – Vol. 53, № 3. – P. 315–321.
443. *Schneider, C.* Two distinct pathways of formation of 4-hydroxy nonenal. Mechanisms of nonenzymatic transformation of the 9- and 13-hydro peroxides of linoleic acid to 4-hydroxyalkenals / C. Schneider, K.A. Tallman, N.A. Porter, A.R. Brash // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 20831–20838.
444. *Schnider, C.* Lipoyxygenase - catalyzed formation of R-configuration hydroperoxides / C. Schnider, A.R. Brash // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* – 2002. – Vol. 68-69. – P. 291–301.
445. *Sebedio, J.L.* Analysis of trans mono- and polyunsaturated fatty acids / J.L. Sebedio, W. M. N. Ratnayake // *Trans fatty acids* / A.J. Dijkstra, R.J. Hamilton, W. Hamm, editors. – Oxford; Ames, Iowa: Blackwell Pub. – 2008. – P. 102–128.
446. *Seiner, D.R.* Kinetics and mechanism of protein tyrosine phosphatase 1 B inactivation by acrolein / D.R. Seiner, J.N. Labutti, K.S. Gates // *Chem. Res. Toxicol.* – 2007. – Vol. 20. – P. 1315–1320.
447. *Selmi, S.* Oxidative stress and cholinesterase inhibition in plasma, erythrocyte and brain of rats pups following lactational exposure to malathion / S. Selmi, S. El-Fazaa, N. Gharbi // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 34, № 12. – P. 753–760.
448. *Selye, H.A.* Syndrome produced by divers nocious agents / H.A. Selye // *Nature.* – 1936. – Vol. 3479. – P. 32–40.
449. *Seok-Yeong, Yu.* Inhibitory effect of high temperature and high pressure – treated red Ginseng on exercise – induced Oxidative stress in ICR mouse / Seok-Yeong Yu, Bo-Ra Yoon, Young-Jun Lee [et al.] // *Nutriens.* – 2014. – Vol. 6, № 3. – P. 1003–1015.
450. *Sharma, J.* Endothelial cell prostaglandin I(2) and platelet-activating factor production are markedly attenuated in the calcium-independent phospholipase A(2)beta knockout mouse / J. Sharma, J. Turk, J. McHowat // *Biochemistry.* – 2010. – Vol. 49. – P. 5473–5481.
451. *Shearer, G.* Impact of circulating esterified eicosanoids and other oxylipins on endothelial function / G. Shearer, J. Newman // *Curr. Atheroscler. Rep.* – 2009. – Vol. 11. – P. 403–410.
452. *Shibata, N.* Acumulation of protein bound 4-hydroxy-2-hexenal in spinal cords from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis / N. Shibata, S. Yamada, K. Uchida [et al.] // *Brain Res.* – 2004. – Vol. 1019. – P. 170–177.

453. *Shienaga, M.K.* Liver and lung microsomal metabolism of the tobacco alkaloid  $\beta$ -nicotyrine / M.K. Shienaga, B.H. Kim, P. Caldera–Munoz [et al.] // *Chem. Res. Toxicol.* – 1989. – Vol. 2. – P. 282–287.

454. *Shulgin, A.T.* The identification and quantitative analysis of cotinine – N-oxide / A.T. Shulgin, P.I. Jacob, N.L. Benowitz, D. Lan // *J. Chromatogr. Biomed. Applic.* – 1987. – P. 365–372.

455. *Sidwell, G.G.* The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation / G.G. Sidwell, J. Salvin, M.F. Benca, J.H. Mitchell // *J. Amer. Oil Chem. Soc.* – 1954. – Vol. 31. – P. 603–606.

456. *Siffringer, M.* Oxygen toxicity is reduced by acetylcholinesterase inhibition in the developing rat brain / M. Siffringer, I. Bendix, C. von Haefen [et al.] // *Develop. Neurosci.* – 2013. – Vol. 35, № 2. – 3. – P. 255–264.

457. *Skipsti, Y.P.* Quantitative analysis of simple lipid classes by thin – layer chromatography / Y.P. Skipsti, J.J. Good, M. Barclay, R.B. Reggio // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1968. – Vol. 152. – P. 10–19.

458. *Smith, W.L.* The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action / W.L. Smith // *Biochem. J.* – 1989. – Vol. 259. – P. 315–324.

459. *Smith, W.L.* Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology / W.L. Smith, L.D. DeWitt, R.M. Garavito // *Annu. Rev. Biochem.* – 2000. – Vol. 69. – P. 145–182.

460. *Sobkowiak, R.* Absorption, metabolism and excretion of nicotine in humans / R. Sobkowiak, A. Lesicki // *Postery Biochem.* – 2013. – Vol. 59, №1. – P. 33–44.

461. *Sono, M.* Heme - containing oxygenases / M. Sono, M.P. Roach, E.D. Coulter, J.H. Danson // *Chem. Rev.* – 1996. – Vol. 96, № 7. – P. 2841–2888.

462. *Spriet, L.L.* New insights into the interaction of Carbohydrate and Fat Metabolism During Exercise / L.L. Spriet // *Sports Med.* – 2014. – Vol. 44, Suppl. 1. – P. 87–96. doi:10.1007/s40279-014-0154-1.

463. *Srivastava, S.* Structural and kinetic determinants of aldehyde reduction by aldose reductase / S. Srivastava, S.J. Watowich, J.M. Petrash [et al.] // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38. – P. 42–54.

464. *Stevens, J.F.* Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease / J.F. Stevens, C.S. Maier // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2008. – Vol. 52. – P. 7–25.

465. *Storz, G.* Oxidative stress / G. Storz, J.A. Implay // *Curr. Opin. Microbiol.* – 1999. – Vol. 2. – P.188–194.

466. *Strassburg, K.* Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC – MS/ MS analysis: application in cardiac surgery / K. Strassburg, A.M. Huijbrechts, K.A. Kortekaas [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – Vol. 404. – P.1413–426.

467. *Stratacis, C.A.* Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system / C.A. Stratacis, G.P. Chronsos // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1995. – Vol. 771. – P. 1–18.

468. *Strong, R.* Nicotinic acetylcholine receptor superfamily of ligand – gated ion channels / R. Strong, M. McCarthy, J. Shiester // *Biochemistry*. – 1990. – Vol. 29. – P. 11009–11023.

469. *Takao, Shimizu.* Lipid Mediators in Health and Disease: Enzymes and Receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and Inflammation / Shimizu Takao // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2009. – Vol. 49. – P. 123–150.

470. *Tallman, K.A.* Phospholipid – protein adducts of lipid peroxidation: Synthesis and study of new biotinulated phosphatidylcholines / K.A. Tallman, H.Y. Kim, J.X. Li [et al.] // *Chem. Res. Toxicol.* – 2007. – Vol. 20. – P. 227–234.

471. *Tang, D.G.* 12(S)-HETE is a mutagenic factor for microvascular endothelial cells: its potential role in angiogenesis / D.G. Tang, C. Renand, S. Stojakovic [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1995. – Vol. 211. – P. 462–468.

472. *Tang, D.G.* The lipoxygenase metabolite 12 (S) HETE induces protein kinase C- dependent cytoskeletal rearrangement and retraction of microvascular endothelial cells / D.G. Tang, J. Timar, I.M. Grassi [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 1993. – Vol. 207. – P. 361–375.

473. *Thome, G.R.* Vitamin U decreased the activity of acetylcholinesterase and level of lipid peroxidation in brain of rats exposed to aged and diluted side stream smoke / G.R. Thome, R.M. Spanevello, A. Mazzanti [et al.] // *Nicotine Tab. Res.* – 2011. – Vol. 13, № 12. – P. 1210–1219.

474. *Tian, L.* Hexamethonium and methyllycaconitine – induced change in acetylcholine release from rat motor nerve terminals / L. Tian, Ch. Prior, J. Dempster, I.G. Marshall // *Brit. J. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 122, № 6. – P. 1025–1034.

475. *Tikchanov, V.I.* Erythrocytes ability for defomation in the period of cooling adaptation formation and in the pilocarpine usage period (peripheral muscarin sensitive cholinceptive agent) as well as in the atropine usage (peripheral muscarin sensitive cholinolytic agent) / V.I. Tikchanov, V.A. Dorovvsky, P.P. Denisenko // XII Symp. Russia–Japan Med. Exchange. – 2005. – P. 635–636.

476. *Tota, S.* Inhibition of central angiotensin converting enzyme ameliorates scopolamine induced memory impairment in mice: role of Cholinergic neurotransmission cerebral blood flow and brain energy metabolism / S. Tota, C. Nath, A.K. Najmi [et al.] // *Behav. Brain Res.* – 2012. – Vol. 232, № 1. – P. 66–76.

477. *Tourdot, B.E.* The emerging role of oxylipins in thrombosis and diabetes / B. E. Tourdot, I. Ahmed, M. Holintat // *Front. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 4. – 716 p.

478. *Triquigneaux, M.* Combined spin trapping EPR / mass spectrometry approach to study the formation of a cyclic peroxide by dienoic precursor autoxidation / M. Triquigneaux, L. Charles, C. Andrer-Barres, B. Tuccio // *Organic Biomol. Chem.* – 2010. – Vol.8, № 6. – P. 1361–1367.

479. *Tsvetkova, D.* Antioxidant Activity of Galantamine and some of its Derivates / D. Tsvetkova, D. Obreshkova, D. Zheleva-Dimitrova, L. Sasol // *Curr. Medicin. Chem.* – 2013. – Vol.6, № 2. – P. 16–32.

480. *Tuma, D.J.* Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration / D.J. Tuma, G.M. Thiele, D. Xu [ et al.] // *Hepatology*. – 1996. – Vol. 23. – P. 872–880.

481. *Tuma, D.* Role of malondialdehyde – acetaldehyde adducts in liver injury / D. Tuma // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – Vol. 32. – P.303–308.

482. *Uchida, K.* Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease / K. Uchida // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. – Vol. 28. – P. 1685–1696.

483. *Upston, J.M.* The role vitamin E in atherosclerosis / J. M. Upston, L. Kritharides, R. Stocker // *Prog. Lipid Res.* – 2003. – Vol. 42, № 5. – P. 405–422.

484. *Usatyuk, P.V.* Modulation of Endothelial Cytoskeleton Focal Adhesion and Adherens Junction Proteins in Regulating Endothelial Barrier Function / P.V. Usatyuk, N. Viswanathan // *Microvasc. Res.* – 2012. – Vol. 83, № 1. – P. 45–55.

485. *Valkel, W.* Glutathione conjugated of 4-hydroxy – 2 (E) nonenal as biomarkers of hepatic oxidative stress – induced lipid peroxidation in rats / W. Valkel, R. Alvarez-Sauchez, I. Weick [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2005. – Vol. 38. – P. 1526–1536.

486. *Van der Donk, W.A.* The cyclooxygenase reaction mechanism / W.A. Van der Donk, A.L. Tsai, R.J. Kulmacz // *Biochemistry*. – 2002. – Vol. 41. – P. 15451–15458.

487. *Walther, M.* Structural basis for the pH - dependent alterations of reaction specificity of vertebrate lipoxygenase isoform / M. Walther, J. Roffeis, C. Jansen [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1791. – P. 827–835.

488. *Wanders, R.J.* Fatty acid omega – oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorder in humans / R. J. Wanders, J. Komen, S. Kemp // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278, № 2. – P. 182–194.

489. *Wang, X.* Muscarinic receptors stimulate calcium influx via phospholipase A2 pathway in ileal smooth muscles / X. Wang, T. Osugi, S. Uchida // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – Vol. 193. – P. 483–489.

490. *Weihing, R.R.* Purification of hepatic microsomal membranes / R.R. Weihing, V.C. Manganiello, R. Chiu, A. H. Phillips // *Biochemistry*. – 1972. – Vol. 11, № 16. – P. 3128–3135.

491. *Wess, J.* Role of conserved threonine and tyrosine residues in acetylcholine binding and muscarinic receptor activation: a study with m3 muscarinic receptor point mutants / J. Wess, R. Maggio, J.R. Palmer [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 19313–19319.

492. *Wess, J.* Site-directed mutagenesis of the m3 muscarinic receptor identification of a series of threonine and tyrosine residues involved in agonist but not antagonist binding / J. Wess, D. Gdula, M.R. Brann. // *EMBO J.* – 1991. – Vol. 10. – P. 3729–3734.

493. *White, R.E.* Stereochemical dynamics of aliphatic hydroxylation by cytochrome P-450 / R.E. White, J.P. Miller, L.V. Favrean, A. Bhattacharyya // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1986. – Vol. 108. – P. 6024–6031.

494. *Widomska, J.* Oxygen permeability of the lipid bilayer membrane made of calcein lipids / J. Widomska, M. Raquz, W.K. Sulczynski // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – Vol. 1768, № 10. – P. 2635–2645.

495. *Wong, S.K.–F.* Chimeric muscarinic cholinergic;  $\beta$  – adrenergic receptor that are functionally promiscuous among G protein / S.K.–F. Wong, E.M. Ross // *J. Biol. Chem.* – Vol. 269. – P. 18968–18976.

496. *Xie, X.Q.* Chemogenomics based polypharmacology analyses of drug, abuse related G-protein coupled receptors and their ligands / X.Q. Xie, L. Wang, H. Lin [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 3.

497. *Yaday, P.* Protective efficacy of 2 - PAMCL, atropine and circumin against dichlorvos induced toxicity in rats / P. Yaday, S.E. Jadhav, V. Kumar [et al.] // *Inter discip. Toxicol.* – 2012. – Vol. 5, № 1. – P. 1–8.

498. *Yamanchi, R.* Addition products of alpha-tocopherol with lipid derived free radicals / R. Yamanchi // *Vitamins Hormones.* – 2007. – Vol. 76. – P. 309–327.

499. *Yeh, K.Y.* Electronic structure models of oxygen adsorption at the solvated electrified Pt (III) interface / K.Y. Yeh, S.A. Wasileski, M.J. Janik // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2009. – Vol. 11, № 43. – P. 10108–10117.

500. *Yeh, K.Y.* Density functional theory – based electrochemical models for the oxygen reduction reaction: comparison of modeling approaches for electric field and solvent effects / K.Y. Yeh, M.J. Janik // *J. Comput. Chem.* – 2011. – Vol. 32, №16. – P. 3399–3408.

501. *Yin, H.* Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis / H. Yin, L. Xu, N.A. Porter // *Chem. Rev.* – 2011. – Vol. 111. – P. 5944–5972.

502. *Yu, Q.-Sh.* Long-acting anticholinesterases for myasthenia gravis: synthesis and activities of quaternary phenylcarbamates of neostigmine, pyridostigmine and physostigmine / Q.-Sh. Yu, H.W. Holloway, W. Luo [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 18, №13. – P. 46870–46930.

503. *Zarzuelo, M.J.* SIRT 1 inhibits NADPH oxidase activation and protects endothelial function in the rat aorta: implications for vascular aging / M.J. Zarzuelo, R. Lopez-Sepulveda, M. Sanchez [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 85, №9. – P. 1288–1296.

504. *Zhang, B.* 15 (S) hydroxyeicosatetraenoic acid induced angiogenesis via activation of PI3K-Akt- m TOR-S6K1 signaling / B. Zhang, G.N. Rao // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 7283–7291.

505. *Zhang, W.* Oxidized phospholipids isolevuglandins and atherosclerosis / W. Zhang, R.G. Salomon // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2005. – Vol. 49. – P. 1050–1062.

506. *Zhou, Y.* Cyclo-oxygenase-1 or -2 mediated metabolism of arachidonic acid in endothelium – dependent contraction of mouse arteries / Y. Zhou, W. Luo, Y. Zhang [et al.] // *Exp. Physiol.* – 2013. – Vol. 90. – P. 1225–1234.

507. *Zivkovic, A.M.* Serum oxylipin profiles in IgA nephropathy patients reflect kidney functional alterations / A.M. Zivkovic, J. Yang, K. Georgi [et al.] // *Metabolomics.* – 2012. – Vol. 8. – P. 1102–1113.

В.И.Тиханов, П.Д.Шабанов

**Не-нейрональный  
ацетилхолин  
печени**

Формат 70x90 1/8

Гарнитура Times

Усл.-п. л. 38,03. Уч.-изд. л. 15,25

Тираж 300 экз.

Издатель – Российская академия наук

Верстка и печать – УНИД РАН

Отпечатано в экспериментальной цифровой типографии РАН

Издается по решению Научно-издательского совета

Российской академии наук (НИСО РАН)

и распространяется бесплатно