

# ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ ПРИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ У КРЫС

УДК 615.275.4: 612.35] 577.352.335  
<https://doi.org/10.7816/RCF17241-48>

© В.И. Тиханов<sup>1</sup>, П.Д. Шабанов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» МЗ РФ, Благовещенск;

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург

Для цитирования: Тиханов В.И., Шабанов П.Д. Холинергические механизмы регуляции свободнорадикального окисления липидов печени при холодовой адаптации у крыс. – 2019. – Т. 17. – № 2. – С. 41–48. <https://doi.org/10.7816/RCF17241-48>

Поступила: 05.04.2019

Одобрена: 15.05.2019

Принята: 18.06.2019

**Цель** — сравнение эффектов холинотропных средств (никотин, пилокарпин, гексаметоний, атропин, неостигмин) на показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) в ткани печени при охлаждении крыс в течение 5 дней с анализом условий, способствующих развитию ПОЛ, субстратных составляющих ПОЛ и содержания продуктов ПОЛ. **Методы.** Биохимически определяли и анализировали содержание адреналина в ткани печени, активность 2,3-ДФГ эритроцитов крови, содержание метиловых эфиров жирных кислот фракции свободных жирных кислот, триплетной формы кислорода и продуктов ПОЛ печени (диеновых конъюгатов, гидроперекисей жирных кислот, малонового диальдегида). Для фармакологического анализа использовали М- (пилокарпин, атропин) и Н- (никотин, гексаметоний) холинергические средства. Холодовую нагрузку создавали, помещая крыс в климатокамеру (–12 °С) на 3 ч ежедневно в течение 5 дней. **Результаты.** М-холиномиметик пилокарпин и Н-холиномиметик никотин действо-

вали разнонаправленно. При этом эффекты пилокарпина совпадали по направленности с эффектами Н-холиноблокатора гексаметония, а действие никотина — с эффектами М-холиноблокатора атропина как в обычных условиях, так и при 5-дневном охлаждении крыс. **Заключение.** На основании анализа полученных результатов сформулированы представления реципрокности между эффектами М- и Н-холинергических средств, когда активация одного подтипа рецепторов, например М-холинорецепторов пилокарпином, по направленности действия совпадает с блокадой Н-холинорецепторов гексаметонием, и наоборот. Эта закономерность реализуется в обычных условиях среды и при холодовом воздействии.

◆ **Ключевые слова:** печень; перекисное окисление липидов; метиловые эфиры жирных кислот C<sub>20</sub>; свободные жирные кислоты; гидроперекиси жирных кислот; малоновый диальдегид; холинергические механизмы; реципрокность; охлаждение.

## CHOLINERGIC MECHANISMS OF REGULATION OF FREE RADICAL OXIDATION OF THE LIVER LIPIDS IN COLD ADAPTATION IN RATS

© V.I. Tikchanov<sup>1</sup>, P.D. Shabanov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Amur State Medical Academy, Blagoveschensk, Russia;

<sup>2</sup> S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

For citation: Tikchanov VI, Shabanov PD. Cholinergic mechanisms of regulation of free radical oxidation of the liver lipids in cold adaptation in rats. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2019;17(2):41-48. <https://doi.org/10.7816/RCF17241-48>

Received: 05.04.2019

Revised: 15.05.2019

Accepted: 18.06.2019

The effects of administration of cholinotropic agents (neostigmine, hexamethonium, pilocarpine, atropine, nicotine) on liver tissue after the 5 days period of cooling of rats were compared. The analysis of the conditions inducing lipid peroxidation (LPO), the analysis of the substrate components of the LPO in liver, and the evaluation of the LPO products content in the 5 days period of cold loads were made. The data obtained indicate on the contradictory effects when pilocarpine and nicotine were administered to animals, as well as after administration of atropine and hexamethonium to animals. There was the similar effects after administration of both pilocarpine and

hexamethonium and both nicotine and atropine in conditions of activated LPO assessed by substrate components of LPO in the liver after 5 days cooling. On the basis of these results, a hypothesis of reciprocity between muscarinic and nicotinic cholinoreceptors located on the plasma membrane of hepatocytes in the LPO processes of the liver during the period of cold loads has been formulated.

◆ **Keywords:** liver, lipid peroxidation, fatty acid methyl esters C<sub>20</sub>, free fatty acids, fatty acid hydroperoxides, malonic dialdehyde, cholinergic mechanisms, reciprocity, cooling.

Работы, выполненные в Институте экспериментальной медицины (Санкт-Петербург), продемонстрировали, что системная блокада М-холинореактивных структур (М-ХР) повышает активность Н-холинорецепторов (Н-ХР), и, наоборот, блокада Н-ХР повышает активность М-ХР [10]. Стимуляцией М-ХР биологической системы можно добиться угнетения Н-ХР образований, а возбуждением Н-ХР — угнетения М-ХР [10]. Было сделано заключение, что существует определенная реципрокность в работе М-ХР и Н-ХР в пределах единой холинергической системы организма [9].

В наших исследованиях, посвященных фармакологическому анализу перекисного (свободно-радикального) окисления липидов (ПОЛ) печени с помощью холинотропных средств (неостигмин, ацетилхолин, гексаметоний, метацин, пилокарпин, атропин, никотин) на фоне охлаждения животных также было отмечено проявление реципрокности между М-ХР- и Н-ХР-образованиями плазматической мембраны гепатоцитов [15]. Результаты комбинированного применения фармакологических агентов миметической направленности (введение неостигмина на фоне предварительно введенных М- или Н-холиноблокаторов) [9] и применения прямых М- и Н-холиномиметиков (пилокарпин, никотин) в целом показывали однонаправленность действия, хотя при этом наблюдалась неоднородность смещения окислительной трансформации продуктов ПОЛ печени, происходящей между диеновыми конъюгатами (ДК), гидроперекисями (ГП) и малоновым диальдегидом (МДА) ткани печени при комбинационном применении холинотропных средств. В этих экспериментах, наряду с комбинацией фармакологических агентов, обуславливающих миметическую направленность за счет высвобождения эндогенного ацетилхолина (АЦХ) в отношении М-ХР и Н-ХР (введение антихолинэстеразных средств), мы применили прямые М- и Н-холиномиметики, но с разной долей массы гетероатомов (атомы кислорода, азота). Таким образом, мы ставили задачу — применить комбинацию фармакологических агентов, приводящих к активации одного из типов холинорецепторов (М-ХР или Н-ХР) в ткани печени после введения только прямых М- или Н-холиномиметиков (пилокарпин или никотин) в сочетании с М- и Н-холиноблокаторами (атропин или гексаметоний) при 5-дневном охлаждении животных.

*Целью данной работы* было выяснить, существует ли реципрокность между М-ХР и Н-ХР в ткани печени в условиях, способствующих развитию ПОЛ, в субстратных составляющих ПОЛ и содержании продуктов ПОЛ печени в период 5-дневных холодовых нагрузок и после введения животным прямых М- или Н-холиномиметиков (пилокарпин или никотин) в комбинации с М- или Н-холиноблокаторами (атропин или гексаметоний).

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор ткани печени в качестве объекта изучения был основан на данных, свидетельствующих, что окислительные системы эндоплазматического ретикула гепатоцитов связаны с ПОЛ мембран гепатоцитов [1]. К тому же среди моделей стресса, связанного с холодовой нагрузкой [19, 22], ткань печени является достаточно удобным объектом для инициирования ПОЛ [21]. Холодовую нагрузку создавали, помещая животных (крыс) опытных групп и животных группы контроль-2 (холод) в климатикамеру при температуре  $-12^{\circ}\text{C}$  на 3 ч в течение 5 дней [15].

При содержании и кормлении животных руководствовались общепринятыми нормами содержания и работы с лабораторными животными [16, 22].

Содержание адреналина в гомогенатах печени определяли методом Лунда (регистрация триоксиндолов методом флуорометрии) [4], активность 2,3-ДФГ эритроцитов крови — неферментативным методом с отдельным определением общего, неорганического фосфора и последующей цветной реакцией с молибдатом аммония [2]. Из субстратных составляющих ПОЛ печени определяли метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) фракции свободных жирных кислот (СЖК), полученных за счет метилирования жирных кислот (ЖК) металлическим натрием [18] и дальнейшего сжигания МЭЖК в пламенно-ионизационном детекторе газового хроматографа с сопоставлением выходных данных по калибровочному эталону МЭЖК 37 Supelco test mix (USA). Молекулярный кислород (триплетная форма кислорода — ТФК) определяли в гомогенате печени методом полярографического анализа [3, 17]. Диеновые конъюгаты (ДК) исследовали по методу И.Д. Стальной [13], гидроперекиси (ГП) — по методу Л.А. Романовой и И.Д. Стальной [12], малоновый альдегид (МДА) — по методу И.Д. Стальной и Т.Г. Гаришвили [14]. Работу с микросомами печени (мембраны эндоплазматического ретикула гепатоцитов — МЭРГ) осуществляли методом И.И. Карузиной [5]. Экстракцию липидов из гомогената печени производили методом Фолча, извлекая неполярные классы липидов [6], а с применением технологии Блайя–Дайлера — полярные липиды [20] с последующим объединением липидных фаз и выделением фракции общих липидов (ОЛ).

Для статистической обработки результатов применяли дисперсионный анализ по Крускалу–Уоллису, парный критерий Манна–Уитни, придерживаясь концепции статистической обработки цифрового материала методом ANOVA (ANalysis Of VAriants). Результаты считали значимыми при  $p < 0,05$  [11].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исходя из допущения существования реципрокности между М-ХР и Н-ХР [7–10], мы анализировали и сопоставляли уровень адреналина в ткани

■ Таблица 1. Уровень адреналина ткани печени (мкг/мл гомогената) и 2,3-ДФГ (мкмоль р/мл эритроцитов) после введения животным холинергических средств на фоне 5-дневного охлаждения

Группа крыс, препарат	Адреналин ткани печени, мкг/мл гомогената	Уровень 2,3-ДФГ, мкмоль Р/мл эритроцитов
Контроль-1 (интактные)	11,6 (10,8–12,1)	12,6 (11,6–12,8)
Контроль-2 (холод)	2,5 (2,3–2,8)*	15,5 (14,8–16,1)*
Холод + пилокарпин 10 мг/кг	2,03 (1,1–2,2)*, **	11,6 (10,8–12,3)**
Холод + никотин 0,5 мг/кг	6,6 (3,8–7,7)*, **	7,6 (16,8–19,1)*, **
Холод + никотин 5 мг/кг	12,1 (10,9–13,4)**	–
Холод + атропин 1 мг/кг	4,35 (3,8–4,8)*, **	17,7 (16,4–18,3)*, **
Холод + гексаметоний 0,2 мг/кг	1,3 (0,9–1,6)*, **	11,1 (10,2–12,1)*, **
Холод + гексаметоний 2 мг/кг	–	12,9 (12,1–14,6)**

Примечание. Здесь и далее в таблицах \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем-1 (интактные); \*\* $p < 0,05$  по сравнению с контролем-2 (холод). Количественные значения представлены в виде медианы и 5-го и 95-го процентилей.

■ Таблица 2. Содержание метиловых эфиров жирных кислот семейства  $C_{20}$  (эйкозатриеновой, эйкозатетраеновой и эйкозопентаеновой) в печени (мкг/мл гомогената) после введения холинергических средств на фоне 5-дневного охлаждения крыс

Группа крыс, препарат	МЭЖК ДГЛК	МЭЖК Эйкоза	МЭЖК Арахис
Контроль-1 (интактные)	1946,0 (1872,0–2110,3)	59,1 (56,7–66,7)	59,6 (48,1–64,7)
Контроль-2 (холод)	480,6 (403,2–512,2)*	31,8 (29,9–37,8)	32,1 (30,6–36,1)*
Холод + пилокарпин 10 мг/кг	295,0 (201,8–350,2)*, **	37,4 (36,1–39,2)	53,4 (48,7–64,6)*, **
Холод + никотин 0,05 мг/кг	547,9 (499,1–612,8)*, **	52,6 (48,7–56,8)*, **	17,8 (16,1–22,1)*, **
Холод + никотин 0,5 мг/кг	–	65,2 (58,4–78,6)*, **	3,4 (1,9–8,9)*, **
Холод + атропин 1 мг/кг	1080,4 (900,2–1926,7)*, **	89,4 (78,4–96,8)*, **	30,2 (27,7–32,5)*, **
Холод + гексаметоний 2 мг/кг	161,5 (102,1–215,4)*, **	26,9 (23,5–29,0)*, **	88,1 (80,1–92,1)*, **
Холод + гексаметоний 20 мг/кг	13,7 (8,2–20,2)*, **	18,8 (16,5–22,2)*, **	–

Примечание. См. обозначения в табл. 1.

печени и 2,3-ДФГ эритроцитов крови (трактуемый в нашей работе как условие, способствующее развитию ПОЛ печени), содержание МЭЖК фракции СЖК печени, ТФК гомогената печени (трактуемые как субстратные составляющие ПОЛ печени), продуктов ПОЛ печени (ДК, ГП, МДА) при введении животным пилокарпина или никотина в сочетании с атропином или гексаметонием на фоне 5-дневного охлаждения.

Холодовая нагрузка в течение 5 дней приводила к уменьшению содержания адреналина в ткани печени и к повышению уровня 2,3-ДФГ эритроцитов крови (табл. 1). Введение животным пилокарпина (10 мг/кг) на фоне холодовой нагрузки снижало уровень адреналина на 18,8 % и уровень 2,3-ДФГ эритроцитов крови в 1,3 раза в сравнении с контролем-2 (холод). Никотин в исследованных дозах (0,5 и 5 мг/кг), напротив, повышал уровень адреналина в ткани печени на 160 и 384 % соответственно и уровень 2,3-ДФГ эритроцитов крови на 23 % при использовании никотина в дозе 0,5 мг/кг.

В то же время атропин (1 мг/кг) повышал, а гексаметоний (0,2 мг/кг) понижал уровень адреналина в ткани печени. При этом атропин (1 мг/кг) умеренно повышал уровень адреналина в ткани печени, а гексаметоний (0,2 и 2 мг/кг) нормализовывал уровень 2,3-ДФГ в эритроцитах крови на фоне 5-дневной холодовой нагрузки до значений интактных животных.

Следовательно, при длительном (5 дней) охлаждении М-холиномиметик пилокарпин понижал уровень

адреналина в ткани печени и 2,3-ДФГ в эритроцитах крови, а Н-холиномиметик никотин вызывал противоположный эффект, повышая уровень адреналина в ткани печени животных и уровень 2,3-ДФГ в эритроцитах крови. М-холинолитик атропин, подобно никотину, повышал уровень адреналина в ткани печени и 2,3-ДФГ в эритроцитах крови, а Н-холинолитик гексаметоний, подобно пилокарпину, снижал все вышеперечисленные показатели.

При сопоставлении данных по МЭЖК фракции СЖК печени отчетливо проявлялись изменения и со стороны ЖК семейства  $C_{20}$ :  $\Delta 11,14,17 C_{20:3}$  эйкозатриеновой ЖК (дигомо- $\gamma$ -линоленовой кислоты, МЭЖК ДГЛК);  $\Delta 5,8,11,14 C_{20:4}$  эйкозатетраеновой ЖК (МЭЖК Арахис) и  $\Delta 5,8,11,14,17 C_{20:5}$  эйкозопентаеновой ЖК (МЭЖК Эйкоза).

Факты, установленные при анализе предыдущих показателей (изменение уровня адреналина ткани печени, 2,3-ДФГ эритроцитов крови и введение животным пилокарпина или никотина), наиболее отчетливо отмечались при определении МЭЖК  $C_{20:3}$  — МЭЖК ДГЛК и МЭЖК  $C_{20:5}$  — МЭЖК Эйкоза. Так, если пилокарпин (10 мг/кг) уменьшал содержание МЭЖК ДГЛК на 61,4 %, то никотин (0,05 мг/кг) увеличивал содержание МЭЖК ДГЛК в 1,2 раза; если возбуждение mACHRs пилокарпином уменьшало содержание МЭЖК Эйкоза до уровня животных контрольной группы (контроль-2), то никотин в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг увеличивал содержание МЭЖК Эйкоза при сравнении с контролем-2 в 1,6 и 2,1 раза соответственно (табл. 2).

Несколько иначе выглядели данные, полученные с МЭЖК Арахиса. Так, пилокарпин (10 мг/кг) на 66,3 % повышал, а никотин (0,5 и 5 мг/кг) снижал выраженность МЭЖК Арахиса в 1,7 и 9,2 раза соответственно при сравнении с данными животных контрольной группы (контроль-2).

Изменения содержания МЭЖК ДГЛК и МЭЖК Эйкоза отмечали и при введении животным холиноблокаторов гексаметония или атропина. Н-холиноблокатор гексаметоний в дозах 2 и 20 мг/кг уменьшал МЭЖК ДГЛК и МЭЖК Эйкоза. М-холиноблокатор атропин (1 мг/кг), напротив, повышал содержание МЭЖК ДГЛК и МЭЖК Эйкоза на 124,8 и 181,1 % соответственно.

Как и в предыдущих опытах, связанных с определением содержания МЭЖК Арахиса фракции СЖК, введением животным холиномиметиков пилокарпина и никотина, холиноблокаторы гексаметоний и атропин вызывали противоположные по направлению изменения — гексаметоний 2 мг/кг повышал, а атропин (1 мг/кг) снижал содержание МЭЖК Арахиса.

Таким образом, М-холиномиметик пилокарпин и Н-холиноблокатор гексаметоний уменьшали содержание МЭЖК ДГЛК и МЭЖК Эйкоза, а Н-холиномиметик никотин и М-холиноблокатор атропин увеличивали содержание МЭЖК ДГЛК и МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени.

В отношении МЭЖК Арахиса были получены иные данные: М-холиномиметик пилокарпин и Н-холиноблокатор гексаметоний повышали, а Н-холиномиметик никотин и М-холиноблокатор атропин уменьшали содержание МЭЖК Арахиса. Таким образом,

в обоих случаях наблюдали реципрокность между эффектами М- и Н-холинергических средств, когда активация одного подтипа рецепторов, например М-холинорецепторов пилокарпином, по направленности действия совпадает с блокадой Н-холинорецепторов гексаметонием, и наоборот.

Подобную реципрокность между М- и Н-холинорецепторами ткани печени отмечали и при анализе содержания ТФК гомогената печени. Так, введение крысам пилокарпина (10 мг/кг) повышало, а введение никотина (0,05 и 5 мг/кг) снижало выраженность ТФК гомогената печени на 3-й минуте опыта. В противоположность этому, гексаметоний (0,2 и 2 мг/кг) снижал, а атропин 1 мг/кг повышал выраженность ТФК гомогената печени до уровня контрольных животных, подвергавшихся охлаждению (табл. 3).

К 30-й минуте опыта данные по определению содержания ТФК гомогената печени выглядели следующим образом. Никотин (0,5 мг/кг) и атропин (1 мг/кг) сходным образом увеличивали, а пилокарпин (10 мг/кг) и гексаметоний во всех исследованных дозах (0,2; 2 и 20 мг/кг) уменьшали содержание ТФК ткани печени при сравнении с результатами групп контрольных животных (контроль-2).

Следовательно, и при оценке содержания ТФК ткани печени была отмечена разнонаправленность эффектов между агонистами и антагонистами М- и Н-холинорецепторов по типу реципрокности, когда эффекты М-холиномиметика пилокарпина и Н-холинолитика гексаметония были однонаправленными, как и действие Н-холиномиметика никотина и М-холинолитика атропина.

■ Таблица 3. Содержание триплетной формы кислорода в гомогенате печени (ммоль  $O_2$ /мл гомогената) после введения холинергических веществ на фоне 5-дневного охлаждения крыс

Группа	Триплетная форма кислорода
3-я минута эксперимента	
Контроль-1 (интактные)	287,2 (285,3–289,0)
Контроль-2 (холод)	277,8 (275,8–279,3)*
Холод + пилокарпин 10 мг/кг	307,8 (304,2–311,2)*, **
Холод + никотин 0,05 мг/кг	225,7 (222,6–228,0)*, **
Холод + никотин 5 мг/кг	227,7 (226,0–229,8)*, **
Холод + атропин 1 мг/кг	272,2 (270,1–273,6)
Холод + гексаметоний 0,2 мг/кг	231,6 (228,6–234,5)*, **
Холод + гексаметоний 2 мг/кг	237,8 (236,8–239,2)*, **
30-я минута эксперимента	
Контроль-1 (интактные)	243,2 (238,3–250,1)
Контроль-2 (холод)	299,1 (293,7–304,8)*
Холод + пилокарпин 10 мг/кг	276,4 (254,5–289,5)*, **
Холод + никотин 0,5 мг/кг	310,9 (299,8–315,6)*, **
Холод + атропин 1 мг/кг	559,0 (534,8–581,5)*, **
Холод + гексаметоний 0,2 мг/кг	221,4 (218,1–224,4)*, **
Холод + гексаметоний 2 мг/кг	276,2 (270,4–287,0)**
Холод + гексаметоний 20 мг/кг	221,0 (219,8–222,6)*, **

Примечание. См. обозначения в табл. 1.

■ **Таблица 4. Содержание гидроперекисей фракции свободных жирных кислот печени (нмоль/мг липида) после введения холинергических средств на фоне 5-дневного охлаждения крыс**

Группа, препарат	Гидроперекиси фракции свободных жирных кислот печени, нмоль/мг липида	Гидроперекиси общих липидов мембран эндоплазматического ретикулума гепатоцитов, нмоль/мг липида
Контроль-1 (интактные)	0,891 (0,796–0,911)	8,3 (7,9–8,9)
Контроль-2 (холод)	1,551 (1,391–1,613)*	6,4 (6,1–7,1) *
Холод + пилокарпин 10 мг/кг	1,769 (1,69–2,032)*, **	7,3 (6,6–8,6)*, **
Холод + атропин 1 мг/кг	0,875 (0,492–1,219)*, **	4,772 (3,076–5,863)*, **
Контроль-2 (холод)	1,661 (1,597–1,892)*	6,5 (6,1–7,2)*
Холод + никотин 0,05 мг/кг	1,581 (1,436–1,687)*, **	1,7 (1,1–2,3)*, **
Холод + никотин 0,5 мг/кг	1,205 (1,023–1,547)*, **	0,8 (0,5–1,3)*, **
Холод + никотин 5 мг/кг	–	0,7 (0,5–1,2)*, **
Холод + гексаметоний 0,2 мг/кг	3,01 (2,322–3,796)*, **	–
Холод + гексаметоний 2 мг/кг	2,277 (1,906–2,475)*, **	–
Холод + гексаметоний 20 мг/кг	3,089 (2,857–3,223)*, **	7,481 (5,911–8,330)*, **

Примечание. См. обозначения в табл. 1.

■ **Таблица 5. Содержание малонового диальдегида (нмоль/мг гомогената) и диеновых конъюгатов общих липидов (нмоль/мг липида) в ткани печени после введения холинергических средств на фоне 5-дневного охлаждения крыс**

Группа, препарат	Малоновый диальдегид ткани печени, нмоль/мг гомогената	Диеновые конъюгаты, нмоль/мг липида
Контроль-1 (интактные)	1,025 (0,903–1,231)	112,2 (105,8–120,1)
Контроль-2 (холод)	1,328 (1,216–1,572)*	102,0 (93,4–103,6)*
Холод + никотин 0,05 мг/кг	0,818 (0,74–0,880)*, **	127,4 (117,1–135,2)*, **
Холод + никотин 0,5 мг/кг	–	127,4 (117,1–135,2)*, **
Холод + никотин 5 мг/кг	–	326,6 (280,1–393,8)*, **
Холод + пилокарпин 10 мг/кг	2,348 (2,01–2,473)*, **	196,4 (107,7–209,8)*, **
Холод + гексаметоний 2 мг/кг	1,745 (1,608–1,886)*, **	–
Холод + гексаметоний 20 мг/кг	2,362 (2,214–2,791)*, **	–
Холод + атропин 1 мг/кг	1,361 (1,306–1,586)	
Контроль-2 (холод)	–	169,0 (159,5–181,7)*
Холод + неостигмин 10 мг/кг	–	134,2 (110,2–156,9)**

Примечание. См. обозначения в табл. 1.

Более того, при сопоставлении данных по влиянию холинергических средств на уровни адреналина, 2,3-ДФГ эритроцитов крови и содержание ТФК ткани печени отмечали не только однонаправленность эффектов, но и признаки синергизма при применении М-холиномиметика (пилокарпин) и Н-холиноблокатора (гексаметоний). Элементы синергизма отмечены и при сопоставлении эффектов Н-холиномиметика (никотин) и М-холиноблокатора (атропин) на данные показатели.

Разнонаправленные эффекты в действии пилокарпина (10 мг/кг) и никотина (0,05 и 0,5 мг/кг) зарегистрированы при изучении их влияния на содержание продуктов ПОЛ фракции СЖК печени. В частности, пилокарпин (10 мг/кг) повышал, а никотин (0,05 и 0,5 мг/кг) понижал концентрацию ГП

фракции СЖК. Сходные эффекты наблюдали и после введения животным гексаметония (0,2; 2 и 20 мг/кг), который увеличивал, а атропин (1 мг/кг) уменьшал содержание ГП фракции СЖК печени (табл. 4), демонстрируя реципрокность в эффектах М- и Н-холинергических средств, отмеченную выше.

Аналогичную закономерность наблюдали при определении ГП в ОЛ МЭРГ (см. табл. 4).

Разнонаправленность эффектов по действию холинергических средств на продукты ПОЛ печени была отмечена и при анализе данных при определении МДА и диеновых конъюгатов ОЛ ткани печени (табл. 5). Так, М-холиномиметик пилокарпин (10 мг/кг) увеличивал продукцию МДА в печени, а никотин (0,05 мг/кг), напротив, ее уменьшал. В свою очередь, если Н-холинолитик гексамето-

ний (0,2 и 20 мг/кг) действовал подобно пилокарпину, увеличивая содержание МДА ткани печени, то М-холинолитик атропин (1 мг/кг) проявлял свойства, аналогичные никотину, уменьшая содержание МДА до уровня контрольных животных (контроль-2). В отношении диеновых конъюгатов такой явной закономерности в эффектах отмечено не было.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Экспериментальные данные указывают на вовлеченность холинергической системы в регуляцию перекисного (свободнорадикального окисления) липидов печени как в обычных условиях, так и в условиях адаптации к холодовому воздействию. Традиционно холинергическую систему рассматривают как исключительно парасимпатическую, то есть реализующую свое влияние на исполнительные органы посредством активации черепных и двигательных нервов. Печень относится к органам, холинергическая регуляция которых осуществляется через блуждающий нерв, следовательно, основным медиатором, который выделяется из постганглионарных окончаний, является ацетилхолин. Ацетилхолин-медиатор активирует оба подтипа холинергических рецепторов — М-холинорецепторы (метаботропные) и Н-холинорецепторы (ионотропные), локализованные на постсинаптической мембране гепатоцитов. Исходя из механизма действия ацетилхолина через эти рецепторы, можно ожидать некие активирующие эффекты ацетилхолина на функции гепатоцитов [1]. Однако понять суть биохимических ответов на возбуждение разных по функциям рецепторов не просто. Тем более если в качестве такого ответа рассматривать отдельные и многочисленные биохимические реакции типа свободнорадикального окисления в гепатоцитах, условия их протекания и отдельные метаболические продукты как показатели активности ПОЛ.

В настоящей работе показано, что в условиях способствующих развитию ПОЛ печени (адреналин ткани печени и 2,3-ДФГ эритроцитов крови), применение М- (пилокарпин) и Н-холиномиметиков (никотин) по-разному, главным образом разнонаправленно, влияет на процессы ПОЛ, при этом направленность действия М-холиномиметиков в целом совпадает с действием Н-холиноблокаторов (гексаметоний), а действие Н-холиномиметиков (никотин) — с действием М-холиноблокаторов (атропин). Это позволяет сделать заключение о возможной реципрокности функционирования между М- и Н-холинорецепторами, когда блокада М-холинорецептора активирует Н-холинорецептивные биохимические системы, и, наоборот, блокада Н-холинорецепторов активирует М-холинорецептивные системы печени. Описанная закономерность была отмечена не только для условий, способствующих развитию ПОЛ пече-

ни (адреналин ткани печени; 2,3-ДФГ эритроцитов крови), но и в отношении субстратных составляющих ПОЛ (МЭЖК  $\Delta$  11,14,17 C<sub>20:3</sub> эйкозотриеновой; МЭЖК  $\Delta$  5,8,11,14 C<sub>20:4</sub> эйкозатетраеновой; МЭЖК  $\Delta$  5,8,11,14,17 C<sub>20:5</sub> эйкозопентаеновой фракции СЖК печени; молекулярного кислорода ткани печени) и, что важно, в продуктах ПОЛ печени — ГП фракции СЖК печени, МДА ткани печени, ГП общих липидов МЭРГ, ДК ОЛ печени. Очевидно, что холинергическая регуляция функций печени (в данном случае свободнорадикальных процессов) подчиняется законам, которые описаны для нервной системы, в этом случае указанная закономерность была выделена на основании лечения хронических нейродегенеративных процессов в головном мозге типа паркинсонизма, эпилепсии, последствий инсультов, периферических нейропатий и т. д. [7, 8].

Совершенно очевидно, что в нашем исследовании речь идет не о классической нервной регуляции в пределах холинергической системы организма, которая вошла в руководства по фармакологии и составила основу биомедицинских представлений. Нужно помнить, что ацетилхолин присутствует не только в синаптических образованиях, но и в крови, причем его содержание в сосудах сопоставимо или даже больше, чем в синапсах [7]. Многие клетки крови, например лимфоциты, несут на себе М- и Н-холинорецепторы и реагируют на холинергические вещества так же, как и нервная система [9], видимо, представляя собой отдельную эволюционно старую управляемую посредством ацетилхолина систему. Именно поэтому полученные нами данные следует рассматривать не только с позиций классического невизма и управления биохимическими процессами в печени через нервную систему посредством медиаторов, но и как изолированную, химически сбалансированную систему, где внутриклеточный сигналинг через рецепторы ацетилхолина реализуется посредством изменения направленности тех или иных реакций. При этом свободнорадикальное окисление не является исключением в этом смысле, а укладывается в закономерность реципрокных взаимоотношений между М- и Н-холинергическими механизмами в рамках единой холинергической системы организма. Такая система включается и функционирует не только в обычных условиях, но и при адаптации к холодовым воздействиям, что, собственно, и было продемонстрировано в настоящей работе. Следовательно, вышеописанные проявления реципрокности, а также отдельного синергизма между М- и Н-холинорецепторными системами позволяют высказать рабочую гипотезу о возможностях управления свободнорадикальными процессами в печени при адаптации к неблагоприятным условиям среды с помощью холинергических препаратов, взаимодействующих с холиноцептивными белками плазматической мембраны гепатоцитов в ПОЛ печени.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Арчаков А.И. Микросомальное окисление. – М.: Наука, 1975. – 327 с. [Archakov AI. Mikrosomal'noe okislenie. Moscow: Nauka; 1975. 327 p. (In Russ.)]
2. Виноградова И.Л., Багрянцева С.Ю., Дервиз Г.В. Неферментативный метод определения 2,3-дифосфоглицериновой кислоты в эритроцитах // Лабораторное дело. – 1976. – № 8. – С. 490–492. [Vinogradova IL, Bagryantseva SYu, Derviz GV. Nefermentativnyi metod opredeleniya 2,3-difosfoglicerinovoi kisloty v eritrotsitakh. *Lab Delo*. 1976;(8):490-492. (In Russ.)]
3. Гейеровский Я., Кута Я. Основы полярографии / Пер. с чешского В.П. Гулятя, В.А. Кузнецова / под ред. д-ра хим. наук С.Г. Майрановского. – М.: Мир, 1965. – 559 с. [Gejerovskij Ya, Kuta Ya. Osnovy polyarografii. Translated from Czech V.P. Gul'tyay, V.A. Kuznetsov. Ed by S.G. Majranovskiy. Moscow: Mir; 1965. 559 p. (In Russ.)]
4. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2 т. – Минск: Беларусь, 2002. – Т. 2. – 463 с. [Kamyshnikov VS. Spravochnik po kliniko-biohimicheskoj laboratornoj diagnostike. Minsk: Belarus'; 2002. Vol. 2. 463 p. (In Russ.)]
5. Карузина И.И., Арчаков А.И. Выделение микросомальной фракции печени и характеристика ее окислительных систем // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 49–59. [Karuzina II, Archakov AI. Vydelenie mikrosomal'noi frakcii pečeni i harakteristika eyo okislitel'nyh system. In: *Sovremennye metody v biohimii*. Ed by V.N. Orekhovich. Moscow: Medicina; 1977. P. 49-59. (In Russ.)]
6. Кейтс М. Техника липидологии: выделение, анализ и идентификация липидов / Пер. с англ. д-ра хим. наук В.А. Вавера. – М.: Мир, 1975. – 322 с. [Kejts M. Tekhnika lipidologii: vydelenie, analiz i identifikatsiya lipidov. Translated from English. Ed. by V.A. Vaver. Moscow: Mir; 1975. 322 p. (In Russ.)]
7. Лосев Н.А., Сапронов Н.С., Хныченко Л.К., Шабанов П.Д. Фармакология новых холинергических средств (фармакология — клинике). – СПб.: Арт-экспресс, 2015. – 368 с. [Losev NA, Sapronov NS, Hnychenko LK, Shabanov PD. Farmakologiya novyh holinerghicheskikh sredstv (farmakologiya – klinike). Saint Petersburg: Art-express; 2015. 368 p. (In Russ.)]
8. Лосев Н.А. О взаимодействии М- и Н- холинореактивных систем организма. Дальнейшее развитие идей С.В. Аничкова // Вестни нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. News of biomedical sciences. – 2001. – № 1. – С. 65–69. [Losev NA. O vzaimodejstvii M- i N- holinoreaktivnyh sistem organizma dalnejshee razvitie idei S.V. Anichkova. *Vesci nacyyanal'nai akadehmii navuk Belarusi*. 2001;(1):65-69. (In Russ.)]
9. Лосев Н.А. Фармакология клинике (с учетом взаимодействия М- и Н- холинергических механизмов): Актовая речь на ученом совете НИИЭМ АМН РФ 23 декабря 2007. – СПб.: НИИЭМ АМН РФ, 2007. – 65 с. [Losev NA. Farmakologiya klinike (s uchyotom vzaimodejstviya M- i N-holinerghicheskikh mekhanizmov): Aktovaya rech' na Uchyonom sovete NIIEM AMN RF 23 dekabrya 2007. Saint Petersburg: NIIEM; 2007. 65 p. (In Russ.)]
10. Лосев Н.А., Шабанов П.Д. Новые данные о применении холинергических средств // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – Т. 15. – Спецвып. 2. – С. 70–71. [Losev NA, Shabanov PD. Noveye dannye o primeneniye holinerghicheskikh sredstv. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2017;15(Suppl 2):70-71. (In Russ.)]
11. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с. [Rebrova OYu. Statisticheskii analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnykh programm STATISTICA. Moscow: MediaSfera; 2002. 312 p. (In Russ.)]
12. Романова Л.А., Стальная И.Д. Метод определения гидроперекисей липидов с помощью тиоционата аммония // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 64–66. [Romanova LA, Stal'naya ID. Metod opredeleniya gidroperekisei lipidov s pomoshch'yu tiocionata ammoniya. In: *Sovremennye metody v biohimii*. Ed. by V.N. Orekhovich. Moscow: Medicina; 1977. P. 64-66. (In Russ.)]
13. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 63–64. [Stal'naya ID. Metod opredeleniya dienovoi kon'yugacii nenasyshchennyh zhirnyh kislot. In: *Sovremennye metody v biohimii*. Ed by V.N. Orekhovich. Moscow: Medicina; 1977. P. 63-64. (In Russ.)]
14. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68. [Stalnaya ID, Garishvili TG. Method for the determination of malonic dialdehyde using thiobarbituric acid. In: *Sovremennye metody v biokhimii*. Ed. by V.N. Orekhovich. Moscow: Meditsina; 1977. P. 66-68. (In Russ.)]
15. Тиханов В.И., Лосев Н.А., Доровских В.А., и др. Изменение продуктов и субстратных составляющих перекисного окисления липидов в ткани печени на фоне холодовой нагрузки и введения непрямых мускариночувствительных и никотиночувствительных холиномиметиков // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2013. – Вып. 50. – С. 61–67. [Tikhanov VI, Losev NA, Dorovskikh VA, et al. The change of lipid peroxidation products and substrate components in the liver tissue against the cold exposure under the introduction of indirect muscarin-sensitive and nikotine-sensitive cholinomimetics. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya*. 2013;(50):61-67. (In Russ.)]
16. Agius L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J*. 2008;414(1):1-18. <https://doi.org/10.1042/BJ20080595>.
17. Al-Khazraji BK, Novielli NM, Goldman D, et al. A simple "streak length method" for quantifying and characterizing red blood cell velocity profiles and blood flow in rat skeletal muscle arterioles. *Microcirculation*. 2012;19(4):327-335. <https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2012.00165.x>.

18. Carrelau JP, Dubaco JP. Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts. *J Chromatogr.* 1978;151(3):384-90. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)88356-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)88356-9).
19. Gouzález B, Manso R. Induction, modification and accumulation of HSP 70s in the rat liver after acute exercise: early and late responses. *J Physiol.* 2004;556(Pt 2):369-385. <https://doi.org/10.1113/physiol.2003.058420>.
20. Kates M. Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Vol. 3, pt. 2. 2<sup>nd</sup> rev. ed. Amsterdam: Elsevier; New York; 1986. 464 p.
21. Poli G. Liver damage due to free radicals. *Br Med Bull.* 1993;49(3):604-620. <https://doi.org/10.1093/oxford-journals.bmb.a072634.22>.
22. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol.* 2014;4(1):177-197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>.
23. Sahin E, Gümüşlü S. 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). *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34(5-6):425-431. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04584.x>

## ♦ Информация об авторах

Виктор Иванович Тиханов — канд. мед. наук, доцент кафедры госпитальной терапии и клинической фармакологии. ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Минздрава России, Благовещенск. E-mail: tikhanov@yandex.ru.

Петр Дмитриевич Шабанов — д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии. ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова», Санкт-Петербург. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

## ♦ Information about the authors

Viktor I. Tikhonov — PhD (Pharmacology), Assistant Professor, Department of Hospital Therapy and Clinical Pharmacology. Amur State Medical Academy, Blagoveshchensk, Russia. E-mail: tikhanov@yandex.ru.

Petr D. Shabanov — Dr. Med. Sci., Professor and Head, Department of Pharmacology. S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia. E-mail: pdshabanov@mail.ru.