

РЕЦИПРОКНОСТЬ МЕЖДУ М- И Н-ХОЛИНОРЕАКТИВНЫМИ СТРУКТУРАМИ ТКАНИ ПЕЧЕНИ ПРИ АНАЛИЗЕ УСЛОВИЙ, СУБСТРАТОВ И ПРОДУКТОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ ПРИ ПЯТИДНЕВНОМ ОХЛАЖДЕНИИ КРЫС

УДК 615.275.4: 612.35] 577.352.335
<https://doi.org/10.7816/RCF17351-58>

© **В.И. Тиханов**

ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Минздрава России, Благовещенск

Для цитирования: Тиханов В.И. Реципрокность между М- и Н-холинореактивными структурами ткани печени при анализе условий, субстратов и продуктов свободнорадикального окисления липидов печени при пятидневном охлаждении крыс // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2019. – Т. 17. – № 3. – С. 51–58. <https://doi.org/10.7816/RCF17351-58>

Поступила: 02.07.2019

Одобрена: 12.08.2019

Принята: 19.09.2019

В ходе исследования были сопоставлены эффекты введения холинотропных средств (неостигмина, гексаметония, пилокарпина, атропина, никотина) на ткани печени при охлаждении крыс в течение 5 дней с анализом условий, способствующих развитию перекисного окисления липидов (ПОЛ) печени, субстратных составляющих ПОЛ печени и оценкой результатов содержания продуктов ПОЛ печени после холодových нагрузок. Получены данные, свидетельствующие о разнонаправленности эффектов, возникающих при введении животным пилокарпина и никотина, а также атропина и гексаметония. Отмечены возникновение и однонаправленность в действии при сопоставлении результатов применения пилокарпина и гексаметония, а также никотина и атропина в условиях, способствую-

щих развитию ПОЛ печени, в субстратных составляющих ПОЛ печени и при оценке результатов содержания продуктов ПОЛ печени при длительном (5 дней) охлаждении животных. На основании анализа полученных результатов сформулированы представления о работе холиноцептивных белков плазматической мембраны гепатоцитов в ПОЛ печени при холодových нагрузках.

◆ **Ключевые слова:** реципрокность; холинотропные средства (неостигмин, гексаметоний, пилокарпин, атропин, никотин); метиловые эфиры жирных кислот C₂₀; фракция свободных жирных кислот; гидроперокси жирных кислот; малоновый диальдегид; адреналин; 2,3-ДФГ эритроцитов крови; печень; охлаждение.

RECIPROCITY BETWEEN MUSCARINIC AND NICOTINIC CHOLINOREACTIVE STRUCTURES OF LIVER TISSUE IN CONDITIONS, IN SUBSTRATES AND IN PRODUCTS OF FREE RADICAL OXIDATION OF LIVER LIPIDS IN 5-DAY PERIOD OF COOLING IN RATS

© **V.I. Tikhanov**

Amur State Medical Academy, Blagoveschensk, Russia

For citation: Tikhanov V.I. Reciprocity between muscarinic and nicotinic cholinoreactive structures of liver tissue in conditions, in substrates and in products of free radical oxidation of liver lipids in 5-day period of cooling in rats. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2019;17(3):51-58. <https://doi.org/10.7816/RCF17351-58>

Received: 02.07.2019

Revised: 12.08.2019

Accepted: 19.09.2019

The effects of administration of cholinotropic agents (neostigmine, hexamethonium, pilocarpine, atropine, nicotine) on liver tissue after 5-day 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 5-day 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-day 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:** reciprocity; cholinotropic agents (neostigmine, hexamethonium, pilocarpine, atropine, nicotine); fatty acids hydroperoxide; fatty acid methyl esters C₂₀; malonic dialdehyde; fractions of free fatty acids; epinephrine; 2,3-DFG of blood erythrocytes; liver cooling.

В ходе работ, выполненных в отделе нейрофармакологии Института экспериментальной медицины (Санкт-Петербург), была установлена закономерность: системная блокада М-холинореактивных структур (М-ХР) увеличивает активность Н-холинорецепторов (Н-ХР), и наоборот, блокада Н-ХР вызывает повышение активности М-ХР [10]. Стимуляцией же М-ХР биологической системы добивались угнетения Н-холинореактивных образований, а возбуждением Н-ХР вызывали угнетение М-ХР [10]. Сделано заключение, что существует определенная реципрокность в работе М-ХР и Н-ХР в пределах единой холинэргической системы организма [9]. Исследования проведены с использованием фармакологического анализа в моделях разных нейродегенеративных заболеваний (эпилепсия, паркинсонизм) [7, 8], а также при отработке методов лечения поражений периферических нервов, проявлений детского церебрального паралича, паркинсонизма и даже некоторых форм шизофрении [9, 10].

В наших исследованиях, посвященных фармакологическому анализу перекисного (свободнорадикального) окисления липидов (ПОЛ) печени с помощью холинотропных средств (неостигмина, ацетилхолина, гексаметония, метацина, пилокарпина, атропина, никотина), на фоне охлаждения животных также было отмечено проявление реципрокности между М-ХР и Н-ХР образованиями плазматической мембраны гепатоцитов [15, 16]. Результаты комбинированного применения фармакологических агентов миметической направленности (введение неостигмина на фоне предварительно введенных М- или Н-холиноблокаторов) [9] и результаты применения прямых М-, Н-холиномиметиков (пилокарпин, никотин) в целом показывали однонаправленность в их действии, хотя при этом отмечалась неоднородность смещения окислительной трансформации продуктов ПОЛ печени, происходящую 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, вызывающих 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). То есть задача была поставлена как изучение применения комбинаций 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, никотин) в сочетании с М- и Н-холиноблокаторами (атропин, гексаметоний) при пятидневном охлаждении животных.

Цель данного исследования — выяснить, существует ли реципрокность между М-ХР и Н-ХР в ткани печени в условиях, способствующих развитию ПОЛ печени, в субстратных составляющих ПОЛ печени по содержанию продуктов ПОЛ печени во время

пятидневных холодных нагрузок и после введения животным прямых М- или Н-холиномиметиков (пилокарпин, никотин) в комбинации с М- или Н-холиноблокаторами (атропин, гексаметоний).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основанием выбора ткани печени в проведенных исследованиях послужили данные, свидетельствующие, что окислительные системы эндоплазматического ретикула гепатоцитов (МЭРГ) связаны с ПОЛ мембран гепатоцитов [1]. К тому же среди моделей стресса, связанного с холодной нагрузкой [20, 23], ткань печени является достаточно удобным объектом для инициирования ПОЛ [22]. Холодовую нагрузку создавали, помещая животных (крыс) опытных групп и животных группы контроль-2 (холод) в климатокамеру при температуре -12°C на 3 часа в течение 5 дней [16].

В вопросах выбора, содержания, кормления руководствовались общепринятыми нормами содержания и работы с лабораторными животными [17, 23].

Содержание адреналина в гомогенатах печени определяли методом Лунда (регистрация триоксииндолов 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 [19] и дальнейшим сжиганием МЭЖК в пламенно-ионизационном детекторе (ПИД) газового хроматографа с сопоставлением выходных данных по калибровочному эталону МЭЖК 37 Supelco test mix (США). Молекулярный кислород (триплетная форма кислорода, ТФК) определяли в гомогенате печени методом полярографического анализа [3, 18]. 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 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 [21] 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). Значимыми результаты считались при $p < 0,05$ [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исходя из допущения существования реципрокности между М-ХР и Н-ХР [7–10], мы анализировали и сопоставляли результаты содержания адреналина в ткани печени, активность 2,3-ДФГ эритроцитов крови (трактуемых в нашей работе как условия, способствующие развитию ПОЛ печени), данные по изменению содержания МЭЖК фракции СЖК печени, ТФК гомогената печени (трактуемых как субстратные составляющие ПОЛ печени), изменение содержания продуктов ПОЛ печени (ДК, ГП, МДА) при введении животным пилокарпина или никотина в сочетании с введением атропина или гексаметония на фоне пятидневного охлаждения.

Холодовая нагрузка в течение 5 дней уменьшала содержание адреналина в тканях печени, но увеличивала активность 2,3-ДФГ эритроцитов крови (табл. 1). Введение животным пилокарпина (10 мг/кг) на фоне холодной нагрузки уменьшало содержание адреналина на 18,8 % и активность 2,3-ДФГ эритроцитов крови в 1,3 раза в сравнении с контролем-2 (холод). Никотин в обеих дозах (0,5 и 5 мг/кг), напротив, увеличивал содержание адреналина ткани печени на 160 и 384 % соответственно и содержание 2,3-ДФГ эритроцитов крови на 23 % при использовании никотина в дозе 0,5 мг/кг.

В то же время атропин (1 мг/кг) увеличивал, а гексаметоний (0,2 мг/кг) уменьшал содержание адреналина в ткани печени. При этом атропин (1 мг/кг) умеренно повышал содержание адреналина в ткани печени, а гексаметоний (0,2 и 2 мг/кг) нормализовал уровень 2,3-ДФГ в эритроцитах крови на фоне пяти-

дневной холодной нагрузки до значений интактных животных (табл. 2).

Следовательно, при длительном (5 дней) охлаждении М-холиномиметик пилокарпин уменьшал содержание адреналина в ткани печени и 2,3-ДФГ в эритроцитах крови, а Н-холиномиметик никотин вызывал противоположный эффект, увеличивая содержание адреналина в ткани печени животных и уровень 2,3-ДФГ в эритроцитах крови. М-холинолитик атропин, подобно никотину, увеличивал содержание адреналина в ткани печени и 2,3-ДФГ в эритроцитах крови, а Н-холинолитик гексаметоний, подобно пилокарпину, снижал все выше перечисленные 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- γ -линоленовой кислоты, МЭЖК ДГЛК); $\Delta 5,8,11,14 C_{20:4}$ эйкозатетраеновой ЖК (МЭЖК Арахид) и $\Delta 5,8,11,14,17 C_{20:5}$ эйкозопентаеновой ЖК (МЭЖК Эйкоза).

Факты, отмеченные нами при анализе предыдущих показателей (изменение содержания адреналина ткани печени, изменение 2,3-ДФГ эритроцитов крови и введении 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) снижал содержание МЭЖК ДГЛК на 61,4 %, то никотин (0,05 мг/кг) повышал МЭЖК ДГЛК в 1,2 раза; если возбуждение М-ХР пилокарпином снижало выраженность МЭЖК Эйкоза до уровня животных контрольной группы (контроль-2, холод), то никотин в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг повышал МЭЖК Эйкоза при сравне-

■ Таблица 1. Содержание адреналина ткани печени (мкг/мл гомогената) и 2,3-ДФГ (мкмоль Р/мл эритроцитов) после введения животным пилокарпина, никотина на фоне пятидневного охлаждения

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

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем-1 (интактные); ** $p < 0,05$ по сравнению с контролем-2 (холод). Количественные значения представлены в виде медианы и процентилей (5-й и 95-й процентиля).

■ Таблица 2. Содержание адреналина ткани печени (мкг/мл гомогената) и 2,3-ДФГ (мкмоль Р/мл эритроцитов) после введения животным атропина или гексаметония на фоне 5-дневного охлаждения

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

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем-1 (интактные); ** $p < 0,05$ по сравнению с контролем-2 (холод). Количественные значения представлены в виде медианы и процентилей (5-й и 95-й процентиля).

■ Таблица 3. Содержание метиловых эфиров жирных кислот семейства C_{20} (эйкозатриеновой, эйкозатетраеновой и эйкозапентаеновой) в печени (мкг/мл гомогената) после введения пилокарпина или никотина на фоне пятидневного охлаждения крыс

Показатели	Контроль-1 (интактные)	Контроль-2 (холод)	Холод + пилокарпин 10 мг/кг	Холод + никотин 0,05 мг/кг	Холод + никотин 0,5 мг/кг
МЭЖК ДГЛК	1946,0 [1872,0–2110,3]	480,6 [403,2–512,2]*	295,0 [201,8–350,2]*, **	–	–
	1958,7 [1872,4–2110,2]	444,4 [403,2–512,2]*	–	547,9 [499,1–612,8]*, **	–
МЭЖК Эйкоза	59,1 [56,7–66,7]	31,8 [29,9–37,8]*	37,4 [36,1–39,2]*	–	–
	60,6 [56,7–66,7]	31,5 [29,9–32,8]*	–	52,6 [48,7–56,8]*, **	65,2 [58,4–78,6]*, **
МЭЖК Арахис	59,6 [48,1–64,7]	32,1 [30,6–36,1]*	53,4 [48,7–64,6]*, **	–	–
	59,9 [48,2–64,7]	31,6 [30,6–36,8]*	–	17,8 [16,1–22,1]*, **	3,4 [1,9–8,9]*, **

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем-1 (интактные); ** $p < 0,05$ по сравнению с контролем-2 (холод). Количественные значения представлены в виде медианы и процентилей (5-й и 95-й процентиля).

■ Таблица 4. Содержание метиловых эфиров жирных кислот семейства C_{20} (эйкозатриеновой, эйкозатетраеновой и эйкозапентаеновой) в печени (мкг/мл гомогената) после введения крысам атропина или гексаметония на фоне пятидневного охлаждения крыс

Показатели	Контроль-1 (интактные)	Контроль-2 (холод)	Холод + атропин 1 мг/кг	Холод + гексаметоний 2 мг/кг	Холод + гексаметоний 20 мг/кг
МЭЖК ДГЛК	1946,0 [1872,0–2110,3]	480,6 [403,2–512,2]*	1080,4 [900,2–1926,7]*, **	–	–
	1958,7 [1872,4–2110,2]	444,4 [403,2–512,2]*	–	161,5 [102,1–215,4]*, **	13,7 [8,2–20,2]*, **
МЭЖК Эйкоза	59,1 [56,7–66,7]	31,8 [29,9–37,8]*	89,4 [78,4–96,8]*, **	Холод + гексаметоний 0,2 мг/кг	–
	60,6 [56,7–66,7]	31,5 [29,9–32,8]*	–	26,9 [23,5–29,0]*, **	18,8 [16,5–22,2]*, **
МЭЖК Арахис	59,6 [48,1–64,7]	32,1 [30,6–36,1]*	30,2 [27,7–32,5]*, **	–	–
	59,9 [48,2–64,7]	31,6 [30,6–36,8]*	–	88,1 [80,1–92,1]*, **	–

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем-1 (интактные); ** $p < 0,05$ по сравнению с контролем-2 (холод). Количественные значения представлены в виде медианы и процентилей (5-й и 95-й процентиля).

нии с контролем-2 в 1,6 раза и в 2,1 раза соответственно (табл. 3).

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

Изменения содержания МЭЖК ДГЛК и МЭЖК Эйкоза были отмечены 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 (табл. 4).

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

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 Арахис были получены иные данные: М-холиномиметик пилокарпин и Н-холиноблокатор гексаметоний повышали,

а Н-холиномиметик никотин и М-холиноблокатор атропин уменьшали содержание МЭЖК Арахиса. То есть в обоих случаях наблюдалась реципрокность между эффектами М-ХР и Н-ХР-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-ХР и Н-ХР 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 третьей минуте опыта. В противоположность этому гексаметоний (0,2 и 2 мг/кг) снижал, а атропин (1 мг/кг) повышал ТФК гомогената печени до уровня контрольных животных, подвергавшихся охлаждению (табл. 5).

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

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

Более того, при сопоставлении полученных нами данных по влиянию холинергических средств на уровень адреналина, 2,3-ДФГ эритроцитов крови и 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 данных по эффектам 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) отмечены при изучении их влияния на содержание продуктов ПОЛ фракции СЖК печени. В частности, пилокарпин (10 мг/кг) увеличивал, а никотин (0,05 и 0,5 мг/кг) уменьшал концентрацию гидроперекисей (ГП) ЖК. Сходные эффекты наблюдали и после введения животным гексаметония (0,2; 2; 20 мг/кг), который увеличивал содержание ГП фракции СЖК печени, и атропина (1 мг/кг), который его снижал (табл. 6), демонстрируя реципрокность в эффектах М- и Н-холинергических средств, отмеченную ранее.

■ Таблица 5. Содержание триплетной формы кислорода в гомогенате печени (ммоль O_2 /мл гомогената) после введения холинотропных веществ на фоне пятидневного охлаждения у крыс

Группы	Триплетная форма кислорода (ТФК)
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: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем-1 (интактные); ** $p < 0,05$ по сравнению с контролем-2 (холод). Количественные значения представлены в виде медианы и процентилей (5-й и 95-й процентиля).

■ Таблица 6. Содержание гидроперекисей фракции свободных жирных кислот печени (нмоль/мг липида) после введения холинергических средств на фоне пятидневного охлаждения крыс

Группа, препарат	Гидроперекиси фракции свободных жирных кислот печени, нмоль/мг липида
Контроль-1 (интактные)	0,891 [0,796–0,911]
Контроль-2 (холод)	1,551 [1,391–1,613]*
Холод + пилокарпин 10 мг/кг	1,769 [1,69–2,032]*, **
Холод + атропин 1 мг/кг	0,875 [0,492–1,219]*, **
Контроль-2 (холод)	1,661 [1,597–1,892]*
Холод + никотин 0,05 мг/кг	1,581 [1,436–1,687]*, **
Холод + никотин 0,5 мг/кг	1,205 [1,023–1,547]*, **
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]*, **

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем-1 (интактные); ** $p < 0,05$ по сравнению с контролем-2 (холод). Количественные значения представлены в виде медианы и процентилей (5-й и 95-й процентиля).

■ Таблица 7. Содержание гидроперекисей общих липидов мембран эндоплазматического ретикулума гепатоцитов (нмоль/мг липида) после введения холинергических средств на фоне пятидневного охлаждения крыс

Группа, препарат	Гидроперекиси общих липидов мембран эндоплазматического ретикулума гепатоцитов, нмоль/мг липида
Контроль-1 (интактные)	8,3[7,9–8,9]
Контроль-2 (холод)	6,4[6,12–7,1]*
Холод + никотин 0,05 мг/кг	1,7 [1,1–2,3]*, **
Холод + никотин 0,5 мг/кг	0,8 [0,5–1,3]*, **
Холод + никотин 5 мг/кг	0,7 [0,5–1,2]*, **
Холод + пилокарпин 10 мг/кг	7,3[6,6–8,6]*, **
Холод + гексаметоний 20 мг/кг	7,481 [5,911–8,330]*, **
Холод + атропин 1 мг/кг	4,772 [3,076–5,863]*, **

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем-1 (интактные); ** $p < 0,05$ по сравнению с контролем-2 (холод). Количественные значения представлены в виде медианы и процентилей (5-й и 95-й процентиля).

■ Таблица 8. Содержание малонового диальдегида (нмоль/мг гомогената) и диеновых конъюгатов общих липидов (нмоль/мг липида) в ткани печени после введения холинергических средств на фоне пятидневного охлаждения крыс

Группа, препарат	Показатели
Малоновый диальдегид ткани печени, нмоль/мг гомогената	
Контроль-1 (интактные)	1,025 [0,903–1,231]
Контроль-2 (холод)	1,328 [1,216–1,572]*
Холод + никотин 0,05 мг/кг	0,818[0,741–0,880]*, **
Холод + пилокарпин 10 мг/кг	2,348 [2,01–2,473]*, **
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]
Диеновые конъюгаты, нмоль/мг липида	
Контроль-1 (интактные)	112,2 [105,8–120,1]
Контроль-2 (холод)	102,0 [93,4–103,6]*
Холод + никотин 0,05 мг/кг	127,4 [117,1–135,2]*, **
Холод + никотин 0,5 мг/кг	296,7 [270,2–314,7]*, **
Холод + никотин 5 мг/кг	326,6 [280,1–393,8]*, **
Холод + пилокарпин 10 мг/кг	196,4 [107,7–209,8]*, **
Контроль-1 (интактные)	143,9 [118,2–158,3]
Контроль-2 (холод)	169,0 [159,5–181,7]*
Холод + неостигмин 10 мг/кг	134,2 [110,2–156,9]**

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем-1 (интактные); ** $p < 0,05$ по сравнению с контролем-2 (холод). Количественные значения представлены в виде медианы и процентилей (5-й и 95-й процентиля).

Аналогичную закономерность наблюдали при определении ГП в ОЛ мембран эндоплазматического ретикулума гепатоцитов (МЭРГ) (табл. 7).

Разнонаправленность эффектов холинергических средств при воздействии на продукты ПОЛ печени была отмечена и при анализе данных при определении МДА и диеновых конъюгатов общих липидов ткани печени (табл. 8). Так, М-холиномиметик пилокарпин (10 мг/кг) увеличивал продукцию МДА в печени, а никотин (0,05 мг/кг), напротив, ее уменьшал. В свою очередь Н-холинолитик гексаметоний (0,2 и 20 мг/кг) действовал подобно пилокарпину, увеличивая содержание МДА ткани печени, а М-холинолитик атропин (1 мг/кг) проявлял свойства, аналогичные никотину, уменьшая содержание МДА до уровня контрольных животных (контроль-2, холод). В отношении диеновых конъюгатов такой явной закономерности в эффектах отмечено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные экспериментальные данные указывают на вовлеченность холинергической системы в регуляцию перекисного (свободно-радикального окисления) липидов печени как в обычных условиях, так и в условиях адаптации к холодному 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, получающим холинергическую регуляцию через блуждающий нерв, следовательно, основным медиатором, который выделяется из его окончаний, является ацетилхолин. Медиатор ацетилхолин 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, мы можем ожидать оказания неких активирующих эффектов ацетилхолина на функции гепатоцитов [7, 16]. Но понять суть биохимических ответов на возбуждение разных по функциям рецепторов нелегко, 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 с М-ХР и Н-ХР, когда блокада М-ХР активирует Н-ХР биохимические системы, и наоборот, блокада Н-ХР — М-ХР системы печени. Полученная закономерность была отмечена не только для условий, способствующих развитию ПОЛ печени (адреналин ткани печени; 2,3-ДФГ эритроцитов крови), но и в отношении субстратных составляющих ПОЛ (МЭЖК $\Delta 11,14,17 C_{20:3}$ эйкозотриеновой; МЭЖК $\Delta 5,8,11,14 C_{20:4}$ эйкозатетраеновой; МЭЖК $\Delta 5,8,11,14,17 C_{20:5}$ эйкозопетаеновой 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 общих липидов печени. Из этого становится очевидным, что холинергическая регуляция функций печени (в данном случае свободнорадикальных процессов) подчиняется законам, которые описаны для нервной системы, где указанная закономерность была выделена на основании лечения хронических нейродегенеративных процессов в головном мозге типа паркинсонизма, эпилепсии, последствий инсультов, периферических нейропатий и т. д. [8, 9].

Совершенно очевидно, что в нашем случае 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 существует 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-ХР и Н-ХР и реагируют на холинергические вещества так же, как и нервная система [10, 15], видимо, эволюционно представляя собой отдельную, старую, сложившуюся, управляемую посредством ацетилхолина систему. Поэтому полученные нами данные следует рассматривать не только с позиций классического нервного 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 направленности изменения тех или иных реакций. И свободно-радикальное окисление, в этом смысле, не является исключением, а укладывается в закономерность реципрокных взаимоотношений между М-ХР и Н-ХР механизмами в рамках единой холинергической системы организма. Такая система включается и функционирует не только в обычных условиях, но при адаптации к холодным воздействиям, что, собственно, и было продемонстрировано в настоящей работе. Следовательно, обсуждаемые факты проявления реципрокности, а также отдельного си-

нергизма между М-ХР и Н-ХР системами позволяют высказать рабочую гипотезу о возможностях направленного управления свободно-радикальными 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, Bagryanceva SYu, Derviz GV. Nefermentativnyj metod opredeleniya 2,3-difosfoglicerinoj kisloty v ehrirocitah. *Laboratornoe delo*. 1976;(8):490-492. (In Russ.)]
3. Гейеровский Я., Кута Я. Основы полярографии / Пер. с чешского В.П. Гультья, В.А. Кузнецова; под ред. д-ра хим. наук С.Г. Майрановского. — М.: Мир, 1965. — 559 с. [Gejerovskij YA, Kuta YA. Zaklady polarografije. Translated from Czech V.P. Gul'tyaj, V.A. Kuznetsov; ed. by S.G. Majranovskij. Moscow: Mir; 1965. 559 p. (In Russ.)]
4. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск: Беларусь, 2000. — 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'noj frakcii pecheni 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 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, Saproinov NS, Hnychenko LK, Shabanov PD. *Farmakologiya novyh holinegicheskikh 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. — 2001. — № 1. — С. 65–69. [Losev NA. O vzaimodejstvii M- i N-holinoreaktivnyh sistem organizma

- dalnejshee razvitie idej S.V. Anichkova. *Vesci nacyyanalnaj akademii 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, 2007. – 65 с. [Losev NA. *Farmakologiya klinike (s uchyotom vzaimodejstviya M- i N-holinergicheskikh mekhanizmov): Aktovaya rech' na Uchyonom sovete NIIEM AMN RF, date 2007 December 23*. 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. – № S2. – С. 70–71. [Losev NA, Shabanov PD. *Novye dannye o primenenii holinerghicheskikh sredstv*. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2017;15(S2):70-71. (In Russ.)]
 11. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. – М.: Медиа Сфера, 2003. – 305 с. [Rebrova OYu. *Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnykh programm Statistica*. Moscow: Media Sfera; 2003. 305 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. 64–65. [Romanova LA, Stal'naya ID. *Metod opredeleniya gidroperekisej lipidov s pomoshch'yu ticionata ammoniya*. In: *Sovremennye metody v biohimii*. Ed. by V.N. Orekhovich. Moscow: Medicina; 1977. P. 64-65. (In Russ.)]
 13. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 63–64. [Stal'naya ID. *Metod opredeleniya dienovoj kon'yugacii nenasyshchennyh vysshih 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. [Stal'naya ID, Garishvili TG. *Metod opredeleniya malonovogo dial'degida s pomoshch'yu tiobarbiturovoj kisloty*. In: *Sovremennye metody v biohimii*. Ed. by V.N. Orekhovich. Moscow: Medicina; 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 введении непрямых мускариновых чувствительных и никотинчувствительных холиномиметиков // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2013. – № 50. – С. 61–67. [Tikhonov VI, Losev NA, Dorovskikh VA, et al. *Izmenenie produktov i substratnykh sostavlyayushchikh perekisnogo okisleniya lipidov v tkani pecheni na fone kholodovoi nagruzki i vvedenii nepriamykh muskarinovychuvstvitel'nykh i nikotinchuvstvitel'nykh kholinomimetikov*. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya*. 2013;(50):61-67. (In Russ.)]
 16. Тиханов В.И., Шабанов П.Д. Холинергические механизмы регуляции свободнорадикального окисления липидов печени при холодовой адаптации у крыс // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2019. – Т. 17. – № 2. – С. 41–48. [Tikhonov VI, Shabanov PD. *Cholinergic mechanisms of regulation of free radical oxidation of liver lipids in cold adaptation in rats*. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2019;17(2):41-48. (In Russ.). <https://doi.org/10.7816/RCF17241-48>.
 17. Agius L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *J Biochem*. 2008;414(1):1-18. <https://doi.org/10.1042/BJ20080595>.
 18. 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>.
 19. Carrelau JP, Dubaco JP. Adaptation of macro – scale method to the microscale for fatty acid methyl tranesterification 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).
 20. 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>.
 21. Kates M. *Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids*. 2nd ed. Amsterdam-NY-Oxford: Elsevier; 1986. 464 p.
 22. Poli G. Liver damage due to free radicals. *Br Med Bull*. 1993;49(3):604-620. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072634>.
 23. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Comp Physiol*. 2014;4(1):177-197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>.
 24. 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 авторе

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

♦ Information about the author

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