

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ ДИЕНОВОЙ КОНЬЮГАЦИИ, МЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ФРАКЦИЙ ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ ХОЛИНОТРОПНЫМИ СРЕДСТВАМИ НА ФОНЕ ПЕРЕОХЛАЖДЕНИЯ КРЫС

УДК 615.275.4: 612.35] 577.352.335
DOI: 10.17816/RCF15133-40

© В.И. Тиханов¹, П.Д. Шабанов²

¹ГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Благовещенск, Россия;

²ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 16.01.2017

Принята к печати 28.02.2017

Ключевые слова:

диеновая конъюгация; метиловые эфиры жирных кислот C_{20} ; общие липиды; фракция свободных жирных кислот; печень; охлаждение; неостигмин; пилокарпин; атропин; крысы.

Резюме

Был произведен анализ изменений содержания диеновой конъюгации, метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) C_{20} общих липидов, фракции свободных жирных кислот (СЖК) печени животных, подвергавшихся действию холода в течение 3 ч и на протяжении 5 дней с введением холинотропных средств. Полученные результаты свидетельствуют об изменении содержания МЭЖК, диеновой конъюгации фракции СЖК печени при вве-

дении животным фармакологических агентов неостигмина, пилокарпина, атропина на фоне холодовой нагрузки. Направление в изменении содержания диеновой конъюгации совпадает с направлением изменения ЖК $C_{20:4}$ $\Delta 5,8,11,14$ -эйкозатетраеновой (ЖК Арахис) при применении пилокарпина, атропина. Сделан вывод о присутствии реципрокности. На основании факта реципрокности высказано предположение и о влиянии мускариночувствительных структур плазматической мембраны гепатоцитов на связь между содержанием МЭЖК C_{20} Арахиса, активностью фосфолипазы A_2 и выраженностью диеновой конъюгации во фракции СЖК печени. Высказано предположение о возможном влиянии холинотропных средств и на активность фосфолипазы A_2 в период охлаждения животных.

PHARMACOLOGICAL ANALYSIS OF CHANGES IN THE CONTENT OF DIENE CONJUGATION, METHYL ESTERS OF FATTY ACIDS OF LIVER LIPID FRACTIONS BY CHOLINOTROPIC AGENTS DURING THE OVERCOOLING OF RATS

© V. I. Tikhanov¹, P. D. Shabanov²

¹Amur State Medical Academy, Blagoveschensk, Russia;

²SM Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

For citation: Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy, 2017;15(1):33-40

Received: 16.01.2017

Accepted: 28.02.2017

◆ **Keywords:** diene conjugation; fatty acid methyl esters C_{20} ; total lipids; fraction of free fatty acids; liver; cooling; neostigmine; pilocarpine; atropine; rats.

◆ **Abstract.** The analysis of changes in the content of diene conjugation, fatty acid methyl esters (FAME) C_{20} of total lipids, fractions of free fatty acids (FFA) in the liver of animals exposed to overcooling for 3 hours and for 5 days after administration of cholinergic agents has been made. The obtained results indicate changing in the content of methyl esters of fatty acids and diene conjugation of FFA fractions after administration of pharmacological agents as neostigmine, pilocarpine, and atropine to animals on

the background of cooling. Changes in the content of diene conjugation coincide with changes in the content of fatty acids (FA) $C_{20:4}$ $\Delta 5,8,11,14$ eicosatetraenoic acids (FA Arakhia) when pilocarpine or atropine was used. The presence of reciprocity was revealed. Basing the reciprocity factor, it was suggested that there was a possible effect of muscarine-sensitive structures of the plasmic membrane hepatocytes on the link between the content of FAME C_{20} Arakhia, phospholipase A_2 activity and the change in the content of diene conjugation in fraction of liver FFA. A possible effect of cholinotropic agents on phospholipase A_2 activity in the period of animal cooling was suggested.

Аллильное и бисаллильное положение метиленовых групп в полиненасыщенных жирных кислотах (PUFAs) C_{20} , совпадение энергии π -электронов атомов углерода аллильных, бисаллильных метиленовых групп с энергией π -электрона атома углерода, находящегося в системе двойных связей PUFAs C_{20} , предопределяет возникновение энергетической нестабильности участков жирных кислот (ЖК), участвующих в перекисном (свободнорадикальном) окислении липидов (ПОЛ) [1]. В присутствии триплетной формы кислорода (ТФК) тканей делокализация двойных связей ненасыщенных компонентов липидов приводит к формированию пентадиениловых мотивов ЖК семейства C_{20} [2, 3]. Последующая деградация сформированного жирно-кислотного мотива приводит к созданию энергетически удобной формы существования данного участка ЖК в виде первичного продукта ПОЛ — диеновой конъюгации (ДК) [4]. Наличие в тканевой среде ТФК с определенной степенью парциального напряжения [5], PUFAs C_{20} с изоленовым типом положения метиленовых групп в дивинилметановых структурах [6] липидных образований тканей становится условием возникновения первичного продукта ПОЛ — ДК [7].

Показано, что холодовые нагрузки приводят к изменению содержания ДК крови [8], легких [9], действие холода вызывает изменение содержания первичного продукта ПОЛ и в мембранах эритроцитов [10]. Отмечается, что действие холода создает условия и для количественного изменения содержания PUFAs C_{20} в липидах тканей [11].

Данные, полученные в лабораториях В.Н. Гурина [12, 13] и П.П. Денисенко [14], свидетельствуют об участии холинергических механизмов в поддержании уровня свободных жирных кислот (СЖК) крови при охлаждении животных [15]. Однако вопрос о влиянии на содержание метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) фракций липидов печени, первичного продукта ПОЛ в период холодовых нагрузок при условии накопления эндогенного ацетилхолина (АЦХ) в ткани печени, влиянии прямых М-холиномиметиков и эффектов их введения животным при переохлаждении не изучался. Поэтому задачей настоящей работы явилась оценка эффектов неостигмина, вводимого на фоне 3-часового охлаждения крыс, а также эффектов пилокарпина и атропина на фоне 5 дней охлаждения крыс с определением содержания МЭЖК C_{20} в общих липидах (ОЛ), фракции СЖК печени и первичного продукта ПОЛ — ДК ОЛ, ДК фракции СЖК печени.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор животных. Основанием выбора ткани печени в изучении поставленных вопросов послужили данные, что окислительные системы мембран эндоплазматического ретикулума гепатоцитов (МЭРП) связаны с ПОЛ плазматических мембран гепатоци-

тов [18]. К тому же в модели стресса, связанного с холодовой нагрузкой [19, 20], ткань печени является достаточно удобной моделью инициирования ПОЛ [21].

Все опыты проведены на крысах-самцах массой 160–200 г. В каждой группе было по 10 животных. Выбор экспериментальных животных основывался на задачах экспериментов, связанных с феноменом стресса [16, 17]. При выполнении работы внимание уделялось содержанию животных в идентичных условиях: соблюдение режима кормления, тепла, отсутствия ограничения доступа к питьевой воде [22, 23]. Для стандартизации углеводного и липидного обменов животных брали в опыты после 12-часового голодания [24, 25]. Создавая холодовую нагрузку, животных опытных групп и животных группы «Контроль-2» (холод) помещали в климатокануру при температуре $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ на протяжении 3 ч и по 3 ч в течение 5 дней [26].

Препаративные методы. Приготовление гомогената печени производилось после декапитации животных, вскрытия брюшной и грудной полостей. Через канюлю, введенную в сердце и нижнюю полую вену, перфузировали печень раствором 5 мМ трис-НСI-буфера (аминометановый буфер, рН 7,4) с содержанием 0,15 М КСI. При дальнейшей работе с тканью печени для определения МЭЖК и диеновой конъюгации из гомогената печени готовился липидный экстракт печени [27].

Экстракция общих липидов из гомогената печени. Экстракцию липидов из гомогената печени производили стандартными методами: методом Фолча извлекали неполярные классы липидов [28], а по технологии Блайя – Дайлера — полярные липиды [29] с последующим объединением липидных фаз, возгонкой растворителя и получения фракции ОЛ печени.

Методом тонкослойной хроматографии нейтральные липиды (фракция СЖК, триглицериды, эфиры холестерина) отделяли от полярных липидов ОЛ печени в системе растворителей гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота [30] без доступа воздуха. Идентификацию фракции СЖК печени производили неспецифическим методом в сосудах с парами йода [31].

Аналитические методы. Аналитическими методами определяли диеновую конъюгацию ОЛ, фракции СЖК печени. После экстрагирования ОЛ из гомогената печени и получения методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) фракции СЖК печени полученные липидные фазы растворяли в перегнанном этаноле. Оптическую плотность содержимого кюветы измеряли при длине волны 233 нм с ходом луча 10 мм. При количественном расчете ДК использовали коэффициент мольной экстинкции $2,2 \times 10^{-5}$ М/см [32]. Величина ДК выражалась в нмолях/мг липида.

Метиловые эфиры жирных кислот. Содержание МЭЖК определяли методом газовой хромато-

графию на колонке с полисилоксановым покрытием для определения полярных соединений [33, 34].

Режимом прогрева колонки подбирался оптимальный режим выхода МЭЖК [35, 36].

Количественные и временные параметры выхода МЭЖК сопоставляли с калибровочными данными по эталону МЭЖК 37 Suspelco test mix (USA).

Фармакологические методы. Принцип подбора применяемого фармакологического агента, накапливающего эндогенный АЦХ в ткани печени, и принципы подбора фармакологических средств, применяемых для возбуждения и блокады М-холинореактивных структур ткани печени, нами описаны ранее [37]. Для фармакологического анализа использовали М-холиномиметик пилокарпин 10 мг/кг, М-холинолитик атропин 1 мг/кг, антихолинэстеразный препарат неостигмин 0,2 мг/кг (все Sigma, США), которые вводили внутривенно.

Статистическая обработка полученных материалов. Статистическая обработка результатов производилась с применением дисперсионного анализа по Крускалу – Уоллису, парного критерия Манна – Уитни, придерживались концепции статистической обработки цифрового материала методом ANOVA. Значимые результаты считались при $p < 0,05$ [38].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Метилловые эфиры жирных кислот в общих липидах, фракции свободных жирных кислот печени. Изменения в содержании МЭЖК C_{20} (Арахис, Эйкоза) ОЛ печени при введении животным неостигмина на фоне 3-часовой холодовой нагрузки не показало существенных отличий от результатов содержания МЭЖК Арахис, Эйкоза ОЛ печени, определяемых в группе животных «Контроль-2» (холод), но при сопоставлении результатов содержания МЭЖК C_{20} групп животных «Опыт» и «Контроль-2» фракции СЖК печени изменения были отмечены (табл. 1).

Так, если холодовая нагрузка, создаваемая животным в течение 3 ч, приводит к уменьшению содержания МЭЖК Арахис фракции СЖК печени на 50 % и отмечается увеличение МЭЖК Эйкоза на 54 % (см. табл. 1), то введение животным неостиг-

мина (0,2 мг/кг) показало увеличение содержания как МЭЖК Арахис, так и МЭЖК Эйкоза: в случае МЭЖК Арахис — в 4,1 раза, а при определении МЭЖК Эйкоза — в 2,6 раза при сравнении с данными животных группы «Контроль-2» (холод) соответственно (см. табл. 1).

Повторение профиля экспериментов, связанного с введением холинотропных средств на фоне охлаждения животных, показывает, что охлаждение животных на протяжении 5 дней + введение прямого М-холиномиметика или М-холиноблокатора сохраняет ту же тенденцию, что и при 3-часовом действии холода и введении непрямого М-, Н-холиномиметика (антихолинэстеразного соединения неостигмина) при определении МЭЖК C_{20} ОЛ печени. Так, если сравнение данных между группами животных «Контроль-1» (интактные) и «Контроль-2» (холод) показывало, что охлаждение в течение 5 дней приводит к уменьшению содержания МЭЖК Арахис, МЭЖК DGLA ОЛ печени, но в отличие от ОЛ печени периода 3-часовой холодовой нагрузки отмечается рост МЭЖК Эйкоза, то введение животным пилокарпина (10 мг/кг) и атропина (1 мг/кг) на фоне 5 дней охлаждения приводило к однонаправленному эффекту — снижению содержания МЭЖК DGLA, Арахис и МЭЖК Эйкоза ОЛ печени (табл. 2).

Данные по определению МЭЖК C_{20} (DGLA, Арахис, Эйкоза) фракции СЖК печени выглядели несколько иначе. Если охлаждение животных в течение 5 дней приводит к снижению содержания всех МЭЖК C_{20} фракции СЖК печени (табл. 3), то введение пилокарпина при данном режиме охлаждения животных увеличивало содержание МЭЖК Арахис в 1,6 раза при сравнении с данными животных группы «Контроль-2», в остальных случаях введение животным пилокарпина достоверно снижало содержание как МЭЖК DGLA, так и МЭЖК Эйкоза.

Атропин, вводимый животным в течение 5 дней охлаждения, вызывал противоположные пилокарпину эффекты: в случае определения МЭЖК Арахис он снижал содержание метилового эфира (МЭ) Арахис на 76,1 %, а в случае определения МЭЖК DGLA и МЭЖК Эйкоза атропин повышал их выраженность в 2,2 и 2,8 раза соответственно.

Таким образом, изменения в содержании МЭЖК C_{20} при введении холинотропных средств (неостигмин на фоне 3 ч охлаждения животных, пилокарпин

■ Таблица 1. Метилловые эфиры жирных кислот C_{20} (Арахис, Эйкоза) фракции свободных жирных кислот печени после 3-часовой холодовой нагрузки и введения животным неостигмина, $n = 10$

Показатели	Метилловые эфиры жирных кислот $\Delta 5,8,11,14 C_{20:4}$ -эйкозатетраеновой (Арахис), мкг/мл	Метилловые эфиры жирных кислот $\Delta 5,8,11,14,17 C_{20:5}$ -эйкозапентаеновой (Эйкоза), мкг/мл
1-я группа, «Контроль-1» (интактные)	6,048 [5,427÷6,924]	72,15 [65,4÷86,5]
2-я группа, «Контроль-2» (холод)	4,0322 [3,708÷4,981] *	111,75 [100,2÷146,8]*
3-я группа, «Опыт» (холод + неостигмин 0,2 мг/кг)	16,678 [15,324÷18,116]*, **	293,3 [257,3÷321,9]*, **

Примечание. Здесь и в остальных таблицах * $p < 0,05$ в сравнении с группой «Контроль-1» (интактные); ** $p < 0,05$ в сравнении с группой «Контроль-2» (холод). Количественные значения представлены в виде медианы и процентилей (5-й и 95-й процентиля)

■ Таблица 2. Метилловые эфиры жирных кислот C₂₀ (DGLA, Арахидонової, Эйкоза) общих липидов печени после 5-дневного охлаждения экспериментальных животных и введения пилокарпина или атропина, n = 10

Показатели	Метилловые эфиры жирных кислот Δ11,14,17 C _{20:3} -эйкозатриеновой жирной кислоты (digomo-γ-linolenic acid, ЖК DGLA)	Метилловые эфиры жирных кислот Δ5,8,11,14 C _{20:4} -эйкозатетраеновой жирной кислоты (Арахидонової), мкг/мл	Метилловые эфиры жирных кислот Δ5,8,11,14,17 C _{20:5} -пентаеновой ЖК (Эйкоза), мкг/мл
1-я группа, «Контроль-1» (интактные)	6155,6 [5906,2÷6513,2]	5,021 [4,724÷5,627]	77,112 [69,568÷91,081]
2-я группа, «Контроль-2» (холод)	5376,1 [5004,9÷5806,2]*	4,285 [3,807÷4,629]*	115,101 [100,2÷132,16]*
3-я группа, «Опыт-1» (холод + пилокарпин 10 мг/кг)	2406,1 [2201,2÷3005,5]*, **	0,414 [0,105÷1,112]*, **	45,151 [38,962÷58,182]*, **
4-я группа, «Опыт-2» (холод + атропин 1 мг/кг)	2966,3 [2802,8÷3305,2]*, **	1,512 [0,107÷2,189]*, **, ***	3,550 [1,608÷8,904]*, **, ***

Примечание. Здесь и далее в таблицах ***p < 0,05 в сравнении с группой «Опыт-1» (холод + пилокарпин)

■ Таблица 3. Метилловые эфиры жирных кислот C₂₀ (DGLA, Арахидонової, Эйкоза) фракции свободных жирных кислот печени после 5-дневного охлаждения и введения животным пилокарпина или атропина, n = 10

Показатели	Метилловые эфиры жирных кислот Δ11,14,17 C _{20:3} -эйкозатриеновой жирной кислоты (digomo-γ-linolenic acid, ЖК DGLA), мкг/мл	Метилловые эфиры жирных кислот Δ5,8,11,14 C _{20:4} -эйкозатетраеновой жирной кислоты (Арахидонової), мкг/мл	Метилловые эфиры жирных кислот Δ5,8,11,14,17 C _{20:5} -эйкозопентаеновой жирной кислоты (Эйкоза), мкг/мл
1-я группа, «Контроль-1» (интактные)	1946,6 [1872,4÷2110,3]	59,6 [48,1÷64,7]	59,1 [56,7÷66,7]
2-я группа, «Контроль-2» (холод)	480,6 [403,2÷512,2]*	32,1 [30,6÷36,1]*	31,8 [29,9÷37,8]*
3-я группа, «Опыт-1» (холод + пилокарпин 10 мг/кг)	295,3 [201,8÷350,2]*, **	53,4 [48,7÷64,6]*, **	37,4 [36,1÷39,2]*, **
4-я группа, «Опыт-2» (холод + атропин 1 мг/кг)	1080,4 [900,2÷1326,7]*, **, ***	30,2 [27,7÷32,5]**, *, ***	89,4 [78,5÷96,8]*, **, ***

■ Таблица 4. Диевые конъюгаты общих липидов печени (нмоль/мг липида) после 3-часового охлаждения крыс и введения неостигмина, n = 10

Показатели	1-я группа, «Контроль-1» (интактные)	2-я группа, «Контроль-2» (холод)	3-я группа, «Опыт» (холод + неостигмин)
Диевые конъюгаты	143,9 [118,2 ÷ 158,3]	169,0 [159,5 ÷ 181,7]*	134,2 [110,2 ÷ 156,9]*, **

и атропин на фоне 5 дней холодовой нагрузки) отмечали только во фракции СЖК печени. Если неостигмин на протяжении 3 ч холода повышал содержание МЭЖК Арахидонової, Эйкоза фракции СЖК (табл. 4), то пилокарпин на протяжении 5 дней действия холода увеличивал выраженность только МЭЖК Арахидонової. Введение животным атропина на фоне 5 дней охлаждения приводило к противоположному эффекту по отношению к МЭЖК Арахидонової фракции СЖК печени — к уменьшению содержания МЭЖК Арахидонової. Оценивая изменения в содержании МЭЖК DGLA и МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени отмечали, что пилокарпин снижал, а атропин повышал их выраженность.

Диевая конъюгация общих липидов фракции свободных жирных кислот печени. В результате изучения введения животным холинотропных средств на фоне предложенных режимов охлаждения (неостигмин на фоне 3 ч холода, пилокарпин, атропин в период 5 дней холода) были получены данные, свидетельствующие об изменении в со-

держании PUFAs C₂₀ фракции СЖК печени. Принято считать, что субстратным составляющим формирования продуктов ПОЛ ткани печени являются PUFAs семейства C₂₀ [4]. Поэтому вопросом, выясняющим влияние холинотропных средств на содержание первичного продукта ПОЛ печени в период охлаждения животных, было изменение содержания ДК ОЛ фракции СЖК липидов печени при введении животным холинотропных средств.

Результаты экспериментов свидетельствуют, что если после 3-часовой холодовой нагрузки увеличение содержания ДК ОЛ печени отмечали в 1,17 раза (табл. 4) при сравнении с данными животных группы «Контроль-1» (интактные), то введение неостигмина на фоне предложенного режима охлаждения животных приводило к снижению ДК ОЛ печени на 25,9 %.

Повторение профиля экспериментов, связанного с определением ДК ОЛ печени при введении пилокарпина, атропина в период 5 дней действия холода, показало, что если холод в течение 5 дней снижает содержание ДК ОЛ на 16,1 % (табл. 5), то введение

■ Таблица 5. Содержание диеновых конъюгатов общих липидов печени после 5 дней охлаждения крыс и введения пилокарпина или атропина, $n = 10$

Показатели	Диеновые конъюгаты, нмоль/мг липида
1-я группа, «Контроль-1» (интактные)	119,4 [105,8÷130,1]
2-я группа, «Контроль-2» (холод)	102,5 [83,6÷108,3]*
3-я группа, «Опыт-1» (холод + пилокарпин 10 мг/кг)	196,4 [107,7÷209,8]*, **
4-я группа, «Опыт-2» (холод + атропин 1 мг/кг)	107,8 [96,1÷128,1]*, **, ***

■ Таблица 6. Содержание диеновых конъюгатов фракции свободных жирных кислот печени (нмоль/мг липида) после 5 дней охлаждения крыс и введения пилокарпина или атропина, $n = 10$

Показатели	Диеновые конъюгаты, нмоль/мг липида
1-я группа, «Контроль-1» (интактные)	19,9 [18,2÷22,2]
2-я группа, «Контроль-2» (холод)	35,8 [32,7÷38,7]*
3-я группа, «Опыт-1» (холод + пилокарпин 10 мг/кг)	40,9 [39,2÷42,9]*, **
4-я группа, «Опыт-2» (холод + атропин 1 мг/кг)	15,2 [13,4÷16,7]*, **, ***

пилокарпина животным приводило к увеличению ДК ОЛ печени в 1,9 раза. Введение же атропина в дозе 1 мг/кг в период 5 дней охлаждения животных снижает содержание ДК ОЛ печени до уровня ДК ОЛ печени, определяемых в группе животных «Контроль-2» (холод).

Определяя содержание ДК фракции СЖК печени при введении крысам пилокарпина или атропина в период 5 дней охлаждения, отмечали, что данный режим холодной нагрузки приводил к росту ДК фракции СЖК печени на 79,8 % при сравнении с животными группы «Контроль-1» (интактные) (табл. 6). Введение же животным пилокарпина на фоне обозначенного режима охлаждения приводило к увеличению ДК на 14,2 % при сравнении с данными животных группы «Контроль-2», а введение животным атропина в период 5 дней действия холода снижало ДК фракции СЖК в 2,3 раза.

Таким образом, если 3-часовой холод приводит к росту содержания ДК ОЛ печени, то введение неостигмина при данном режиме охлаждения животных приводит к снижению ДК ОЛ печени; если 5-дневная холодная нагрузка снижает содержание ДК ОЛ печени, то введение пилокарпина при заданном холодном режиме увеличивает его выраженность, введение же атропина (1 мг/кг) снижает его содержание до уровня ДК ОЛ печени, определяемого у животных, подвергавшихся только охлаждению («Контроль-2»).

Оценивая ДК фракции СЖК печени на фоне 5 дней охлаждения животных и введения холинотропных средств (пилокарпин, атропин), получили следующие результаты. Содержание ДК в период 5-дневной холодной нагрузки у животных группы «Контроль-2» (холод) увеличивалось в сравнении с животными, не подвергавшимися холодной нагрузке. Введение пилокарпина увеличивало выраженность определяемого показателя в большей степени, а введение атропина уменьшало ДК фракции СЖК печени в сравнении с результатами у крыс, подвергавшихся только охлаждению.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенных исследованиях было показано, что введение холинотропных средств (неостигмин, пилокарпин, атропин) на фоне 3-часового и 5-дневного охлаждения крыс приводит к изменениям со стороны МЭЖК C_{20} ОЛ и фракции СЖК печени. Отмечаются однонаправленные изменения при оценке содержания МЭЖК Арахидной, Эйкоза ОЛ печени, но разнонаправленные изменения со стороны МЭЖК DGLA, Арахидной, Эйкоза фракции СЖК печени. Введение холинотропных средств на фоне предложенных режимов охлаждения животных разнонаправленно влияет на содержание и первичного продукта ПОЛ печени — ДК ОЛ и ДК фракции СЖК печени. Так, если введение неостигмина на фоне 3-часового действия холода в сравнении с животными, подвергавшимися только охлаждению, уменьшает ДК ОЛ печени, то введение пилокарпина на фоне 5 дней холодной нагрузки увеличивает содержание ДК ОЛ печени. Введение пилокарпина в период 5 дней охлаждения увеличивает ДК фракции СЖК печени, в то время как введение крысам атропина уменьшает выраженность ДК фракции СЖК.

Исходя из данных литературы, свидетельствующих о приоритетном участии в формировании процесса ПОЛ ЖК $C_{20:4}$ $\Delta 5,8,11,14$ эйкозатетраеновой (ЖК Арахидной) [39], способности ЖК Арахидной участвовать в создании пентадиениловых мотивов алифатической цепочки ЖК [40], нами отмечено совпадение направленности изменений при оценке содержания ДК и содержания МЭЖК Арахидной фракции СЖК печени, связанных с введением холинотропных средств. Введение животным пилокарпина в период 5 дней охлаждения демонстрировало увеличение ДК фракции СЖК печени, увеличение отмечалось и в содержании МЭЖК Арахидной фракции СЖК. Введение атропина на фоне 5 дней холода демонстрирует противоположные пилокарпину изменения: атропин снижает ДК и уменьшает содержание МЭЖК Арахидной фракции СЖК.

Сопоставляя факты, оценивающие изменения ДК и МЭЖК Арахидной фракции СЖК печени при введении животным пилокарпина или атропина на фоне 5 дней холодовой нагрузки, можно сделать вывод о проявлении некой реципрокности изменений, связанной с вовлечением М-холинореактивных структур плазматических мембран гепатоцитов. Безусловно, нами не сбрасывается со счетов способность и других МЭЖК семейства C_{20} фракции СЖК печени участвовать в формировании начальных продуктов ПОЛ. Так, было отмечено, что введение пилокарпина на фоне 5 дней охлаждения животных приводило к снижению МЭЖК DGLA, МЭЖК Эйкоза фракции СЖК. Введение же животным атропина сопровождалось противоположным результатом — повышением содержания оцениваемых МЭЖК C_{20} .

Следует отметить, что в МЭЖК DGLA, МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени при введении крысам пилокарпина или атропина отмечается явление, подобное реципрокности (напоминаем, что пилокарпин снижает, а атропин повышает МЭЖК DGLA, МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени на фоне 5 дней охлаждения животных). Действительно, оценивая и сопоставляя данные по содержанию МЭЖК DGLA, МЭЖК Эйкоза при введении животным пилокарпина и атропина, мы получаем явление, подобное реципрокности, но, сравнивая результаты содержания ДК и МЭЖК DGLA, ДК и МЭЖК Эйкоза фракции СЖК печени, такой реципрокности не возникает, и мы отмечаем несовпадение по направлению содержания как ДК, так и МЭЖК DGLA, МЭЖК Эйкоза. Несовпадение направленности изменений между ДК и содержанием МЭЖК DGLA, Эйкоза фракции СЖК при введении животным пилокарпина и атропина можно объяснить как иное расходование пулов ЖК DGLA и ЖК Эйкоза при формировании продуктов ПОЛ печени в период охлаждения животных. Если приоритетом фракции СЖК печени является присутствие только неэстерифицированных PUFAs [41, 42], то можно предположить, что холинотропные средства (неостигмин на фоне 3 ч холода, пилокарпин и атропин в период 5 дней холодовых нагрузок) способны влиять на активность фосфолипазы A_2 . Основанием для предположения о возможном влиянии холинотропных средств на активность фосфодиэстеразы A_2 (фосфолипаза A_2) в условиях холодовых нагрузок могут служить факты увеличения содержания МЭЖК Арахидной фракции СЖК печени, вызываемого пилокарпином, и уменьшения содержания МЭЖК Арахидной фракции СЖК, связанного с введением атропина, что, вероятно, обусловлено в случае пилокарпина его М-холиномиметической активностью, а в случае атропина — М-холинолитическим эффектом. В связи с вышесказанным можно утверждать, что если субстратным обеспечением активности фосфолипазы A_2 является ЖК Арахидной, то накопление эндогенного АЦХ в ткани печени, вызванное неостигмином, предположительно влияет на активность фосфолипазы A_2 , возможно, через изменение содержания субстрата ПОЛ печени — ЖК Арахидной.

Обобщая результаты проведенных исследований, связанных с оценкой содержания ДК ОЛ, ДК фракции СЖК печени, и сопоставляя их с данными по содержанию МЭЖК C_{20} ОЛ фракции СЖК печени при введении животным холинотропных средств (неостигмин, пилокарпин, атропин) на фоне 3-часового и 5-дневного охлаждения животных, можно высказать мнение о влиянии М-холинореактивных структур плазматической мембраны гепатоцитов на формирование начального продукта ПОЛ печени — ДК фракции СЖК печени. В связи с тем что изменения по содержанию МЭЖК C_{20} , ДК липидов печени нами отмечены во фракции СЖК печени, высказываем предположение не только о возможном влиянии холинотропных средств (неостигмин, пилокарпин, атропин) на активность фосфолипазы A_2 в период холодовых нагрузок, но и о возможном существовании связи между изменениями активности фосфолипазы A_2 , содержания МЭЖК C_{20} и содержания ДК фракции СЖК печени, регулируемых холинэргической системой, точнее ее М-холинэргическим компонентом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Farmer EH, Koch HP, Sutton DA. The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds. Rearrangement of double bonds during an autoxidation. *J Chem Soc.* 1943;541-546. doi: 10.1039/jr9430000541.
2. Szori M, Imre G, Viskolcz C, Nonenzymatic B. Pathway of PUFAs oxidation. A first principles study of the reactions of OH radicals with 1,4-pentadiene and arachidonic acid. *J Chem Theory Computation.* 2008;4(9):1472-1479. doi: 10.1021/ct800127a.
3. Roberts J, Milne GL. Isoprostane. *J Lipid Res.* 2009;50(Suppl):219-223. doi: 10.1194/jlr.R800037-JLR200.
4. Schnaider C. An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53(3):315-321. doi: 10.1002/mnfr.200800131.
5. Тиханов В.И., Лосев Н.А., Доровских В.А., и др. Триплетная и активная формы кислорода ткани печени экспериментальных животных на фоне охлаждения и введения ацетилхолина в ткань печени *in situ* // Бюл. физиол. и патол. дыхания. – 2015. – № 56. – С. 107–112. [Tikhonov VI, Losev NA, Dorovskikh VA, et al. Tripletная i aktivnaya formy kisloroda tkani pecheni eksperimental'nykh zhivotnykh na fone okhlazhdeniya i vvedeniya atsetilkholina v tkan' pecheni in situ. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya.* 2015;(56):107-112. (In Russ.)]
6. Porter NA, Caldwell S, Mills KA. Mechanisms of free radicals oxidation of unsaturated lipids. *Lipids.* 1995;30:277-290. doi: 10.1007/BF02536034.
7. Xu Y, Gu Y, Qian SY. An advanced Electron Spin Resonance (ESR) spin-trapping and LC/ (ESR)/MS technique for the study of lipid peroxidation. *Int J Mol Sci.* 2012;11:14648-14666. doi: 10.3390/ijms131114648.
8. Тиханов В.И. Влияние периферических модуляторов холинэргии на перекисное окисление липидов в период

- длительной холодовой нагрузки // Современные аспекты диагностики, лечения и профилактики заболеваний человека. – Благовещенск, 2002. – Т. 12. – С. 568–574. [Tihanov VI. Vlijanie perifericheskikh moduljatorov holinergii na perekisnoe okislenie lipidov, v period dlitel'noj holodovoj nagruzki. *Sovremennye aspekty diagnostiki, lechenija i profilaktiki zabolevanij cheloveka*. Blagoveshhensk; 2002;12:568-574. (In Russ.)]
9. Круглова О.Г., Доровских В.А., Тиханов В.И., и др. Влияние диgidрокверцетина на продукты перекисного окисления липидов при холодом воздействием // Дальневосточный мед. журнал. – 2011. – № 3. – С. 90–92. [Kruglova OG, Dorovskih VA, Tihanov VI, et al. Vlijanie digidrokvercetina na produkty perekisnogo okislenija lipidov pri holodovom vozdzejstvii. *Dal'nevostochnyj medicinskij zhurnal*. 2011;(3):90-92. (In Russ.)]
 10. Бородин А.Е., Доровских В.А., Бородина Г.П., и др. Перекисное окисление липидов и функциональные свойства эритроцитов при действии холода // Бюл. СО РАМН. – 1992. – № 4. – С. 79–84. [Borodin AE, Dorovskih VA, Borodina GP, et al. Perekisnoe okislenie lipidov i funkcional'nye svojstva jeritroцитов pri dejstvii holoda. *Bjulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk*. 1992;(4):79-84. (In Russ.)]
 11. Казначеев В.П., Куликов В.Ю. Синдром полярного напряжения и некоторые вопросы экологии человека в высоких широтах // Вестник АМН СССР. – 1980. – Т. 1. – С. 74–82. [Kaznacheev VP, Kulikov VJu. Sindrom poljarnogo naprjazhenija i nekotorye voprosy jekologii cheloveka v vysokih shirotah. *Vestnik AMN SSSR*. 1980;1:74-82. (In Russ.)]
 12. Гурин В.Н. Холинергические механизмы в регуляции обмена свободных жирных кислот // Фармакологическая регуляция обменных процессов / Краткие тезисы республиканской конференции. – Л., 1972. [Gurin VN. Holinergicheskie mehanizmy v reguljácii obmena svobodnyh zhirnyh kislot. (Conference proceedigs) *Farmakologicheskaja reguljacija obmennyh processov / Kratkie tezisy respublikanskoj konferencii*. Leningrad; 1972. (In Russ.)]
 13. Гурин В.Н., Богрицевич Ю.И. Влияние блокады и возбуждения М-холинореактивных систем на уровень свободных жирных кислот, кетоновых тел и сахара в крови крыс // Фармакология и токсикология. – 1972. – Т. 35. – № 6. – С. 691–695. [Gurin VN, Bogricevich Ju. Vlijanie blokady i vozbuzhdenija M – holinoreaktivnyh sistem na uroven' svobodnyh zhirnyh kislot, ketonovyh tel i sahara v krvi kryс. *Farmakologija i toksikologija*. 1972;35(6):691-695. (In Russ.)]
 14. Денисенко П.П. Участие холинореактивных систем в регуляторных процессах. Фармакологическая регуляция жизнедеятельности организма через холинореактивные системы. – Л.: Наука, 1979. – С. 176–177. [Denisenko PP. Uchastie holino – reaktivnyh sistem v reguljatornyh processah. *Farmakologicheskaja reguljacija zhiznedejatel'nosti organizma cherez holinergicheskie sistemy*. Leningrad: Nauka; 1979. P. 176-177. (In Russ.)]
 15. Гурин В.Н. Обмен липидов при гипотермии, гипертермии и лихорадке. – Минск: Беларусь, 1986. – С. 7–57. [Gurin VN. Obmen lipidov pri gipotermii, gipertermii i lihoradke. Minsk: Belarus; 1986. P. 7-74. (In Russ.)]
 16. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. – М.: Наука, 1960. – 254 с. [Selye H. Ocherki ob adaptacionnom sindrome. Moscow: Nauka; 1960. 254 p. (In Russ.)]
 17. Малыгина Е.И., Петухов В.И. Влияние центральных холинолитиков на гипергликемию при травматическом шоке. Фармакология центральных холинолитиков и других нейротропных средств. – Л.: Медицина, 1969. – С. 125–154. [Malygina EI, Petuhov VI. Vlijanie central'nyh holinolitikov na giperqlikemiju pri travmaticheskom shoke. *Farmakologija central'nyh holinolitikov i drugih nejrotroпnyh sredstv*. Leningrad: Medicina; 1969. P. 125-154. (In Russ.)]
 18. Арчаков А.И. Микросомальное окисление. – М.: Наука, 1975. – 327 с. [Archakov AI. Mikrosomal'noe okislenie. Moscow: Nauka; 1975. 327 p. (In Russ.)]
 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(Pt2):369-385. doi: 10.1113/physiol.2003.058420.
 20. 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):425-431. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04584.x.
 21. Poli G. Liver damage due to free radicals. *Brit Med Bull*. 1993;49(3):604-620. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072634.
 22. Moberg GP, Mench JA. The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. NY: CABI publishing; 2000. doi: 10.1079/9780851993591.0000.
 23. Bramhal M, Florez-Vargas O, Stevens R. Quality of methods reporting in animal models of colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(6):1248-1259. doi: 10.1097/mib.0000000000000369.
 24. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Comp Physiol*. 2014;4(1):177-197. doi: 10.1002/cphy.c130024.
 25. Agius L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *J Biochem*. 2008;414:1-18. doi: 10.1042/BJ20080595.
 26. 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 // Бюл. физиол. и патол. дыхания. – 2013. – № 50. – С. 61–67. [Tihanov VI, Losev NA, Dorovskih VA, et al. Izmenenie produktov i substratnykh sostavlyayushchikh perekisnogo okisleniya lipidov v tkani pecheni na fone kholodovoi nagruzki i vvedenii nepryamykh muskarino-chuvstvitel'nykh i nikotino-chuvstvitel'nykh kholinomimetikov. *Bjulleten' fiziologii i patologii dykhaniya*. 2013;(50):61-67. (In Russ.)]
 27. Штарберг М.А. Антиокислительные свойства комбинированных препаратов фосфолипидов с производными малоновой и тиобарбитуровой кислот: Дис. ... канд. мед. наук. – Чита, 1996. [Shtarberg MA. Antiokislitel'nye svojstva kombinirovannyh preparatov fosfolipidov s proizvodnymi maloновой и тиобарбитуровой кислот: Дис. ... канд. мед. наук. – Чита, 1996. [Shtarberg MA. Antiokislitel'nye svojstva kombinirovannyh pre-

- paratov fosfolipidov s proizvodnymi malonovoj i tiobarbiturovoj kislot. [dissertation] Chita; 1996. (In Russ.)]
28. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226:497-509.
 29. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37:911-917. doi: 10.1139/o59-099.
 30. Некрасов Э.В. Фосфолипаза D растений. Распространение, возможная физиологическая роль: Дис. ... канд. биол. наук. – Благовещенск, 2000. [Nekrasov EV. Fosfolipaza D rastenij. Rasprostranenie, vozmozhnaja fiziologicheskaja rol'. [dissertation] Blagoveshchensk; 2000. (In Russ.)]
 31. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., и др. Справочник биохимика: пер. с англ. – М.: Мир, 1991. [Doson R, Jelliot D, Jelliot U, et al. Spravochnik biohimika. Moscow: Mir; 1991. (In Russ.)]
 32. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. [Stal'naja ID. Metod opredelenija dienovoj kon'jugacii nenasysyhennyh vysshih zhirnyh kislot. Sovremennye metody v biohimii. Ed by V.N. Orehovich. Moscow: Medicina; 1977. (In Russ.)]
 33. Cameron G. Separate FAME cis and trans isomers with DB-23. *J Lipids*. 2001;14(3):13.
 34. Myher JJ, Kuksis A. Resolution of diacylglycerol moieties of natural glycerophospholipids by gas – liquid chromatography on polar capillary columns. *Can J Biochem*. 2008;60(2):638-650.
 35. Radermacher P, Grote H, Susanto F. Method for the gas chromatographic determination of long and medium chain free fatty acids in serum. *J Clin Chem Clin Biochem*. 2008;20(11):813-815.
 36. Moss CW, Shinoda T, Samuels JW. Determination of cellular fatty acid compositions of various yeasts by gas-liquid chromatography. *J Clin Microbiol*. 2009;16(6):1073-1079.
 37. 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 // Бюл. физиол. и патол. 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 nepryamykh muskarinochuvstvitel'nykh i nikotinochuvstvitel'nykh kholinomimetikov. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya*. 2013;(50):61-67. (In Russ.)]
 38. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М.: Медиа Сфера, 2002. – 312 с. [Rebrova OYu. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Moscow: Media Sfera; 2002. 312 p. (In Russ.)]
 39. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 250 с. [Vladimirov JuA, Archakov AI. Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranah. Moscow: Nauka; 1972. 250 p. (In Russ.)]
 40. Pratt DA, Mills JH, Porter NA. Theoretical calculation of carbon-oxygen bond dissociation enthalpies of peroxy radicals formed in the autoxidation of lipids. *J Amer Chem Soc*. 2003;125:5801-5810. doi: 10.1021/ja034182j.
 41. Chalimoniuk M. Secretory phospholipase A2 and its role in oxidative stress and inflammation. *Postery Biochemii*. 2012;58(2):204-208.
 42. Reed K, Tucker D, Alonlon A, et al. Functional characterization of mutations in inherited human c PLA2 deficiency. *Biochemistry*. 2011;50:1731-1738. doi: 10.1021/bi101877n.
 43. Sharma J, Turk J, McHowat J. Endothelial cell prostaglandin I(2) and platelet-activating factor production are markedly attenuated in the calcium-independent phospholipase A(2) beta knockout mouse. *Biochemistry*. 2010;49:5473-5481. doi: 10.1021/bi100752u.

◆ Информация об авторах

Виктор Иванович Тиханов — канд. мед. наук, доцент кафедры госпитальной терапии с курсом фармакологии. ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия» МЗ РФ, Благовещенск. E-mail: tikhonov@yandex.ru.

Петр Дмитриевич Шабанов — д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

◆ Information about the authors

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

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