

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ
УКРАИНСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ

На правах рукописи

ЭЛЬ-ХАТИБ АМЕР МУХАМЕД

УДК 577.156.6:577.157.2:612.115

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ КАРОТИНСОДЕРЖАЩИХ РАСТИТЕЛЬНЫХ
МАСЕЛ НА ТКАНЕВЫЕ ФАКТОРЫ СВЕРТЫВАНИЯ

03.00.04 - биохимия

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Киев - 1993

№ 27. Удс
Работа выполнена в Киевском государственном институте усовершенствования врачей МЗ Украины

Научные руководители: д.м.н., проф. Липкан Г.Н.
д.м.н. Мхитарян Л.С.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук В.А. Жила
доктор медицинских наук В.И. Коржов

Ведущая организация: Украинский государственный медицинский университет им. акад. А.А. Богомольца

Защита состоится 14 апреля 1993 г. в _____ час _____ мин.,
на заседании Специализированного Совета Д 088.19.01 при
Украинском научно-исследовательском институте фармакологии и
токсикологии МЗ Украины / 252057, Киев, ул. Эжена Потье, 14/.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Украинского
НИИ фармакологии и токсикологии МЗ Украины

Автореферат разослан "12" марта 1993 г.

ЛНБ України ім. В. Стефаніка



00803309 (N)

И.о. ученого секретаря
Специализированного Со
доктор медицинских наук,
профессор

В.С. Даниленко

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Растительные каротинсодержащие масла обладают радиозащитным, общеукрепляющим, противовоспалительным, ранозаживляющим и другими видами лечебно-профилактического действия. В последние годы облепиховое масло фармакопейное /М.Д. Мамковский, 1988/, пищевые лечебно-профилактические масла, получаемые из облепихи, черноплодной рябины, бета-каротин микробиального производства /ТУ 10-04-02-02-86/ и другие широко используются во всех областях медицины. Ведется разработка, изучение способов получения и биологическая оценка масел из различного растительного сырья, в частности, из бархатцев распротертых /А.с. № 913625, 16 ноября 1981 г./. Есть немногочисленные работы, указывающие на то, что эти масла обладают выраженными фармакологическими эффектами. Однако, их специфическое действие и безвредность изучены еще далеко не полностью. Это касается и изучения их влияния на тканевые факторы свертывания. Известно, что последние во многом определяют нормальную микроциркуляцию и функцию различных органов и тканей /мозга, сердца, печени и др./ В.П.Скипетров, 1983/. При изменении проницаемости клеточных мембран, стрессе тканевой тромбопластин в значительных количествах может попадать в кровоток и вызывать ряд нарушений, определяющих течение основного заболевания или патологического процесса, нарушая физиологические функции органов и тканей. В связи с этим является актуальным изучение влияния каротинсодержащих растительных масел на тканевые факторы свертывания в условиях моделирования стресса, сопровождающегося нарушением распределения тканевых факторов свертывания между тканями и сосудистым руслом.

Цель исследования — Изучить характер нарушений в тканевом звене гемостаза при экспериментальном иммобилизационном стрессе и возможности их коррекции каротинсодержащими маслами / облепиховым, арониевым, бархатцевым, раствором бета-каротина в растительном масле /.

Задачи исследования.

1. Дать оценку фармакологического действия масел, полученных по различной технологии экстракции сырья различными растительными маслами /оливковым, кукурузным, соевым, подсолнечным /.

2. Определить разницу в действии каротинсодержащих масел при однократном и курсовом применении.

3. Установить зависимость между дозировками масел, оказывающими витаминное действие и в меньших дозировках / до 10 % от ежедневной потребности в бета-каротине/.

4. Изучить изменения состояния тканевых факторов свертывания с про- и антикоагулянтной активностью в условиях стресса и влияния на них каротинсодержащих масел.

Основные положения, вынесенные на защиту.

1. Бетакаротинсодержащие растительные масла в условиях иммобилизационного стресса, повышающего активность тканевого тромбопластина в ткани головного мозга, сердца, печени, обладают статистически достоверной антитромбопластиновой активностью при лечебно-профилактическом применении в течение 20 дней, не влияя существенным образом на другие факторы свертывания крови тканей: антитромбиновый, антигепариновый, фибринолитическую активность.

2. В дозе 0,002 мг/кг массы / в пересчете на бета-каротин/ достоверной активностью и существенным влиянием на тканевой тромбопластин обладает только черноплоднорябиновое и бархатцевое масла. Так как эта доза на два порядка ниже количества бета-каротина, оказывающих провитаминное действие, его можно отнести за счет дру-

гих биологических и фармакологических эффектов. Это позволяет рекомендовать использование растительных бета-каротинсодержащих масел не только как источников провитамина А-бета-каротина, но и как препаратов, благоприятно действующих на тромбопластиновую активность тканей в условиях иммобилизационного и возможно других стрессорных ситуаций, причем в этих случаях в составе растительных масел каротин эффективен в меньших дозах, чем суточная потребность в нем как провитамином препарате.

3. Очевидно, в растительном сырье, из которого получают бета-каротинсодержащие масла / облепихе, черноплодной рябине, бархатцах/ есть группа веществ - синергистов бета-каротина, усиливающих его действие на тканевой тромбопластин, так как в дозе 0,002 мг/кг массы животных чистый бета-каротин не оказывает антитромбопластинного действия, а в составе бета-каротинсодержащих масел в этой же дозе он обладает статистически достоверным антитромбопластиновым влиянием.

4. Полученные в эксперименте данные позволяют рекомендовать более широкое использование бета-каротинсодержащих растительных масел в клинической практике при заболеваниях, сопровождающихся активацией тромбопластиновых компонентов - ИБС, инфарктах миокарда, стрессах, неблагоприятных воздействиях внешней среды, как пищевых добавок к жирам, обладающим гиперкоагуляционной активностью в условиях целостного организма человека и животных.

5. Необходимы дальнейшие разработки по детальному изучению и клиническому использованию новых каротин-содержащих масел из черноплодной рябины и бархатцев распротертых, так как они обладают более значительной биологической активностью, чем хорошо изученное и широко применяющееся в клинической практике облепиховое масло.

Научная новизна работы.

1. В доступной литературе нет данных по изучению влияния экспериментального стресса на тканевые факторы свертывания и возможности коррекции этих изменений каротинсодержащими маслами. Биохимическая оценка показателей тканевых факторов свертывания проведена впервые при вышеприведенных воздействиях.

2. Впервые проведена сравнительная оценка каротинсодержащих масел, полученных с использованием различных экстрагентов / оливкового, кукурузного, соевого, подсолнечного масла/. Показано, что биологическое действие зависит только от химического состава экстрагируемого сырья / облепихового, арониевого шрота, цветков бархатцев и др./ и не определяется экстрагентом.

3. Впервые получены данные, указывающие на то, что бета-каротинсодержащие масла обладают существенным действием на тканевые факторы свертывания в дозах на порядок меньших концентраций, оказывающих витаминный эффект / предотвращающих развитие гиповитаминозов/.

4. В работе впервые проведен сравнительный анализ эффективности известных и новых бета-каротинсодержащих препаратов коррекции изменений активности тканевых факторов свертывания, вызванных экспериментальным иммобилизационным стрессом. При этом показано преимущество арониевого и бархатцевого масел в сравнении с облепиховым.

5. Теоретически обоснована и экспериментально доказана возможность создания эффективных корректоров тканевой системы свертывания крови на основе каротин-содержащих растительных масел, изучены их мембранотропные свойства.

Практическое значение работы.

1. Проведен сравнительный анализ изменений тканевых факторов свертывания при действии различных бета-каротинсодержащих масел в условиях иммобилизационного стресса. Показана более значительная эффективность арониевого и бархатцевого масла по сравнению с облепиховым, что определяет необходимость более широкого их внедрения в практику здравоохранения.

2. На модели иммобилизационного стресса отмечалась активация тромбопластиновых компонентов тканей и их коррекция под влиянием бета-каротинсодержащих масел. Полученные результаты экспериментально обосновывают целесообразность лечебно-профилактического применения последних с целью коррекции гиперкоагуляционных изменений в целостном организме, вызываемых стрессорными и другими воздействиями внешней среды.

3. Изучение биохимических показателей тканевой системы свертывания при стрессе показало, что наиболее существенные изменения претерпевает активность тканевого тромбопластина. Это нужно учитывать при переносе полученных экспериментальных данных в клинику. Активация тканевого тромбопластина может быть причиной гиперкоагуляционных изменений и тромбозов.

4. В механизмах благоприятного действия бета-каротинсодержащих масел на животный организм необходимо учитывать их мембраностабилизирующие эффекты, доказанные в условиях экспериментального иммобилизационного стресса.

Реализация результатов исследования. Данные, полученные в работе будут использованы при разработке технических условий на производство отдельных бета-каротинсодержащих масел — облепихового, арониевого, бархатцевого, как витаминных добавок к пище, а также при подготовке материалов на фармакопейные статьи и в Фармакологический комитет.

Полученные в работе данные используются в учебном процессе кафедр клинической биохимии Харьковского института усовершенствования врачей, кафедр клинической лабораторной диагностики Киевского, Харьковского, Запорожского институтов усовершенствования врачей.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались и обсуждались на третьей украинской конференции по медицинской ботанике / 1992 г/, 1У съезде врачей-лаборантов Белоруссии.

По теме диссертации опубликовано 3 печатных работы.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертации изложены на 118 страницах, содержат 16 таблиц и 12 рисунков. Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 12 глав экспериментальных исследований, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 162 источника отечественных и 37 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 570 половозрелых белых крысах линии "Вистар" массой 180–240 г. Тканевые экстракты каждого органа готовили следующим образом: навеску ткани из расчета 200 мг в 1,8 мл физиологического раствора гомогенизировали и центрифугировали при 1500 об/мин, используя в дальнейшем надосадочную жидкость / 10% экстракт/. Из него путем последовательных разведений физиологическим раствором готовили 1%; 0,5%; 0,1%; 0,05%; 0,01% экстракты. Для оценки состояния факторов свертывания тканей изучали тромбопластиновую и антитромбиновую активность, антигепариновое действие / К.Т.Титова, Ю.П.Никитин, 1968; Ю.Н.Оборина, Ю.П.Никитин, 1968/. Тромбопластиновое и антигепариновое влияние тканевых экстрактов изучали во всех вышеуказанных концентрациях, антитромбиновое – в 10 %, поскольку антитромбиновые субстанции неустойчивы к разведению / В.П.Скипетров, 1978 /.

Тромбопластиновое действие тканей определяли по их влиянию на свертывание обедненной тромбоцитами субстратной плазмы. В качестве последней использовали бестромбоцитарную субстратную плазму доноров, полученную сначала общепринятым методом, а затем повторно отцентрифугированную при 3000 об/мин в течение 10–30 минут, чтобы при добавлении к ней 0,1 мл 0,277% раствора хлористого кальция свертывание происходило, в среднем, за 120–130 секунд.

Аналогичный субстрат использовали и при определении антигепариновой активности тканей. В качестве стандартного раствора тромбина опытным путем подбирали такую его концентрацию, которая вызывала свертывание 0,2 мл субстратной плазмы с 0,3 мл физиологического раствора за 15 секунд. Контролем служила гепаринизированная субстратная плазма / с 0,1 мл гепарина в концентрации

0,45 ед/мл/, тромбиновое время которой составляло, в среднем 50 секунд.

При определении антитромбиновой активности субстратом служила донорская цитратная плазма, полученная общепринятым способом. При этом использовали стандартный раствор тромбина, который вызывал свертывание субстратной плазмы, в среднем, за 30 секунд /контроль /.

Вышеуказанные показатели изучали в головном мозге, сердце и печени всех исследуемых групп животных / в тканевых экстрактах /, а также в отдельных субклеточных фракциях.

С целью изучения точки приложения действия бета-каротинсодержащих масел на тканевое звено гемостаза, в тканях сердца и печени, где изменения факторов свертывания были четко выражены, выделяли субклеточные фракции /сарколема сердца/, микросомы /саркоплазматический ретикулум/, митохондрии и цитоплазму.

Выделение субклеточных фракций осуществляли гомогенизацией тканей, отделением фракций путем дифференциального многократного центрифугирования и очистки /промывки / полученных фракций в соответствующих средах при температуре 0-4°C с использованием препаративной ультрацентрифуги АС-602 /Германия/ и 1-5-50 /Бекман-США/ / Э.Медли, 1979/. Качество и степень чистоты выделенных фракций определяли с помощью маркерных ферментов / А.А.Болдырев, 1986/. В частности, выделение плазматической мембраны гепатоцитов /сарколеммы/ проводили по методу Г.М.Кравцова и соавт. /1979/. Очистку мембран проводили на 4-х сахарозных градиентах концентрациями 50-60 %. Необходимую фракцию выделяли между градиентами 52,5-55 % по методу P.J.Louis, P.V. Sulake /1976/.

Микросомальную фракцию /саркоплазматический ретикулум/ выделяли по методу S.Narigaya et al. /1969/. Митохондрии получали

по методу С.Н.Ногесон, С. Schneider / 1948 /.

Цитоплазматическую жидкость клеток выделяли по методу В.В.Куприянова и соавт. /1978/. О качестве и степени чистоты выделенных препаратов судили на основании определения активности маркерных ферментов. Активность этих ферментов измеряли по приросту уровня неорганического фосфора в инкубационной среде. Для плазматической мембраны гепатоцитов /сарколеммы/ маркером служила 5-нуклеотидаза /Н.Н.Аронсон, О.Тонстер , 1974/, для микросом /саркоплазматического ретикулума/ — азидустойчивая Ca^{2+} - АТФ-аза /А.Нартонси, Р.Феретос , 1964/, для митохондрий — цитохромоксидаза /D.C.War-ton, А.Фрагоloff , 1967/.

С целью изучения липидного состава мембран из суспензий последних получали липидные экстракты хлороформ-метаноловой смесью / I.M. Folch et al. , 1957/, которые использовали для количественного определения холестерина /М.Кейто, 1965/, фосфолипидов /В.Г. Колб, В.С.Камышников, 1982/. Содержание отдельных классов фосфолипидов изучали с использованием метода тонкослойной хроматографии в силикагеле на стандартных пластинах "Силуфол- UV - 254" /Л.Н.Величко и соавт., 1980/. Содержание липидов мембран рассчитывали на белок, концентрацию которого определяли по О. Lowry /1951/. Содержание жирных кислот в мембранах определяли спектрофотометрически по W. Duncombe /1964/. Изучение пассивного транспорта Ca^{2+} через плазматическую мембрану гепатоцитов /сарколемму/ изучали с использованием изотопа $^{45}\text{CaCl}_2$ и техники миллипорового фильтрования / Э.Д.Воробец и соавт., 1983/.

Вышеперечисленные показатели изучали у интактных крыс и у животных, подвергшихся иммобилизационному стрессу. При этом возникали стрессорные язвы, которые являлись показателем стрессорной ре-

акции. По данным D.A.Brodie, H.M.Hanson /1960/ частота язв у крыс, вызываемых 24-часовой иммобилизацией составляет 86-88 %. Нас привлекла эта модель по той причине, что язвы желудка, образующиеся у животных в результате искусственно вызываемого невроза /стресса/ по мнению ряда авторов ближе всего стоят по своему происхождению к язвам желудка у человека при нейрогенных формах язвенной болезни /С.В.Аничков, И.С.Заводская, 1965; С.В. Аничков и соавт., 1969/.

В условиях наших опытов у 86 % животных возникали язвенные поражения с индексом Паулса свыше 7 /F.Pauls et al.1947, А.А.Акимов, 1968 /. У них мы и изучали активность тканевых факторов свертывания и другие вышеперечисленные показатели.

Экспериментальные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента / А.К.Белоус, В.И. Колодяжный, 1971; И.Т.Шевченко, 1970 /.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучаемые бета-каротинсодержащие растительные масла вводили белым крысам перорально из расчета 0,2 мг/кг массы и 0,002 мг/кг массы животных в объеме от 0,2 до 0,5 мл зондом. Изучали действие девяти бета-каротинсодержащих масел: облепиховое масло, экстрагируемое кукурузным; облепиховое масло, экстрагируемое соевым; облепиховое масло, экстрагируемое подсолнечным рафинированным маслом; облепиховое масло, экстрагируемое оливковым маслом Турецкого производства; арониевый бальзам производства "Центр Росток" на подсолнечном масле; бархатцевое масло, экстрагируемое кукурузным; бархатцевое масло, экстрагируемое соевым; масляный раствор бета-каротина в кукурузном масле. Все перечисленные масла стандартизовались по концентрации в них бета-каротина, определяемого по фармакопейной статье /ФС 42-1730-81 /.

При изучении показателей тканевых факторов свертывания жизненно важных органов интактных крыс было обнаружено, что в норме ткани головного мозга, сердца и печени обладают мощными коагулирующими свойствами на фоне слабой или практически не выявляемой антикоагулянтной активности. Тканевые экстракты исходной концентрации /10 %/ головного мозга и печени интактных животных укорачивают время свертывания контрольной бестромбоцитарной субстратной плазмы на 57 %. Сердце обладает более сильным тромбопластиновым действием, чем головной мозг и печень. Его экстракты снижают время свертывания субстратной плазмы на 74 %. Тромбопластиновый потенциал экстрактов сохраняется во всех изучаемых концентрациях /от 10 % до 0,01 %/. В условиях иммобилизационного стресса тромбопластиновая активность увеличивается, а время свертывания крови бестромбоцитарной субстратной плазмы сокращается в сравнении со временем свертывания тканевых экстрактов интактных животных. Снижение времени свертывания бестромбоцитарной субстратной плазмы статистически достоверно как в группе крыс с иммобилизационным стрессом, сопровождающимся язвенными поражениями /их отмечали визуально на слизистой желудка/, так и в группе животных с иммобилизационным стрессом без язвенных поражений. Так, например, при 0,5 % концентрации тканевых экстрактов головного мозга у крыс с язвами время свертывания бестромбоцитарной плазмы с 122 секунд сокращалось до $59,9 \pm 2,0$, а без язвенных поражений — до $60,3 \pm 2,6$ секунд /у интактных животных — до $81,3 \pm 1,8$ секунд /; при добавлении тканевых экстрактов сердца 0,5 % концентрации время свертывания сокращалось соответственно до $56,6 \pm 3,3$ и $57,0 \pm 4,0$ /у интактных животных — $78,3 \pm 3,6$; при добавлении тканевых экстрактов печени 0,5 % концентрации время свертывания плазмы сокращалось, соответственно до

75,4 ± 3,8 и 78,9 ± 1,9 / у интактных животных-91,3 ± 3,1 /. Во всех опытах сокращение времени свертывания при добавлении тканевых экстрактов животных, подвергшихся иммобилизационному стрессу было статистически достоверным по сравнению с интактными животными.

При лечебно-профилактическом применении бета-каротинсодержащих масел в дозе 0,002 мг/кг массы животных перорально в течение 20 дней статистически достоверный эффект мы получили только при применении арониевого бальзама производства "Центр Росток" и масла бархатцевого. Масло облепиховое, экстрагированное оливковым маслом Ливанского и Турецкого производства не оказывало существенного действия на тромбопластиновые компоненты / Табл. 1 /. В этой дозе не эффективен также масляный раствор бета-каротина, приготовленный из кристаллического препарата производства Верхне-Днепровского крахмалопаточного комбината / Украина // Табл. 2 /. Как показали проведенные исследования, фармакологическая активность масляных растворов бета-каротина не зависела от качества и вида масла, которым проводили экстракцию / кукурузное, соевое, оливковое, подсолнечное/, а определялась химическим составом исходного бета-каротинсодержащего сырья / облепиха, черноплодная рябина, бархатцы распротертые/. Причем бета-каротинсодержащие масла из нетрадиционного сырья - черноплодной рябины и бархатцев распротертых, полученные по технологии производства облепихового масла / Л.А.Иванова, 1991 / по своей фармакологической активности в дозе 0,002 мг/кг превосходили последнее, как видно из данных таблиц 1 и 2.

При той же постановке опыта в дозе 0,2 мг/кг массы все изученные каротинсодержащие масла обладали в условиях иммобилизационного стресса четкой нормализующей активностью на тромбопластин тканей головного мозга, сердца и печени и антистрессорным действием. Если иммобилизация интактных животных приводила к активации тромбопласти-

Таблица I

Тромбопластиновые свойства головного мозга, сердца и печени крыс, которым вводили перорально в течение 20 дней в дозе 0,002 мг/кг масло облепиховое, экстрагированное оливковым маслом Ливанского производства / 1 /, масло облепиховое, экстрагированное оливковым маслом Турецкого производства / 2 /, арониевый бальзам производства "Центр Росток" / 3 /.

Тканевые экстракты органов. %	Группа животных			
	1	2	3	
головного мозга	10	43,3 ± 3,0	44,1 ± 2,8	59,4 ± 3,7
	I	50,5 ± 3,0	49,8 ± 2,8	67,7 ± 2,9**
	0,5	57,0 ± 3,0	57,1 ± 3,0	84,0 ± 2,5***
	0,1	67,9 ± 3,3	66,3 ± 4,0	91,9 ± 2,0**
	0,05	74,4 ± 2,9	74,2 ± 4,0	106,0 ± 4,5*
	0,01	90,0 ± 4,2	86,1 ± 3,3*	121,9 ± 5,1**
сердца	10	28,9 ± 0,6	30,8 ± 0,6**	33,3 ± 1,3**
	I	43,4 ± 2,2	45,7 ± 2,2	68,3 ± 3,4**
	0,5	59,4 ± 3,3	56,8 ± 3,3	81,8 ± 3,4**
	0,1	62,3 ± 5,1	67,2 ± 5,1	90,6 ± 2,0**
	0,05	76,1 ± 5,1	73,3 ± 4,5	98,1 ± 2,0***
	0,01	78,6 ± 4,6	82,4 ± 4,3	114,1 ± 3,5***
печени	10	51,3 ± 1,9*	45,2 ± 1,0**	59,9 ± 2,6
	I	61,1 ± 2,0	54,0 ± 2,6	78,6 ± 3,6*
	0,5	69,7 ± 2,6	69,1 ± 3,9	91,3 ± 3,0*
	0,1	75,2 ± 2,8*	78,5 ± 2,7*	98,5 ± 2,5*
	0,05	83,4 ± 2,9	86,5 ± 2,7	107,4 ± 3,4**
	0,01	88,3 ± 2,6	94,9 ± 3,1*	115,4 ± 2,0***

Примечания: I. Время свертывания бестромбоцитарной субстратной плазмы 122,0 - 9,0 сек.

* p < 0,05 по сравнению с интактными крысами,

** p < 0,01 - " -

*** p < 0,001 - " -

Таблица 2

Тромбопластиновые свойства головного мозга, сердца и печени крыс, которым вводили перорально в течение 20 дней в дозе 0,002 мг/кг масло бархатцевое, экстрагированное кукурузным / 1 /, масло бархатцевое, экстрагированное соевым / 2 /, масляный раствор бета-каротина / 3 /.

Тканевые экстракты органов, %		Группа животных		
		1	2	3
головного мозга	10	59,4 ± 3,7	57,1 ± 3,5	46,7 ± 3,4
	1	67,7 ± 2,9**	71,2 ± 3,0**	48,2 ± 2,4
	0,5	84,0 ± 2,5***	83,6 ± 2,0***	54,0 ± 2,0
	0,1	91,9 ± 2,0**	96,1 ± 3,1**	60,9 ± 4,1
	0,05	105,0 ± 4,5*	103,7 ± 4,3*	73,9 ± 3,7
	0,01	121,9 ± 5,1**	122,7 ± 4,0**	85,4 ± 2,3*
сердца	10	79,3 ± 0,9***	42,5 ± 1,0***	28,8 ± 1,4
	1	74,7 ± 3,4**	67,1 ± 3,1**	57,1 ± 3,1
	0,5	83,8 ± 3,2**	78,3 ± 3,7**	60,1 ± 2,8
	0,1	89,9 ± 3,7**	91,0 ± 2,8**	63,8 ± 3,1
	0,05	96,0 ± 3,9**	99,7 ± 2,2***	68,1 ± 3,5
	0,01	113,0 ± 3,1***	112,5 ± 3,7***	74,8 ± 4,2
печени	10	55,7 ± 2,9	61,4 ± 2,2	42,5 ± 1,2**
	1	83,2 ± 3,7**	79,1 ± 3,1*	55,6 ± 1,1
	0,5	96,7 ± 3,1**	94,5 ± 3,4**	67,4 ± 2,3
	0,1	103,4 ± 2,6**	103,0 ± 2,5**	78,6 ± 2,3*
	0,05	108,2 ± 1,8***	109,7 ± 1,8***	86,5 ± 2,0
	0,01	118,2 ± 2,5***	118,6 ± 1,7***	92,2 ± 2,6

Примечания: 1. Время свертывания бестромбоцитарной субстратной плазмы 122,0 - 9,0 сек.

* p < 0,05 по сравнению с интактными крысами,

** p < 0,01 " " "

*** p < 0,001 " " "

новых компонентов, то иммобилизация животных, которым с лечебно-профилактической целью вводили бетакаротинсодержащие масла на протяжении 20-дневного курса, практически не приводила к активации тканевого тромбопластина. Механизм действия бета-каротинсодержащих масел реализуется через тромбопластиновую активность тканей, так как другие факторы свертывания тканевой системы — антигепариновое, антитромбиновое действие, фибринолиз в условиях наших экспериментов не претерпевали существенных статистически достоверных изменений.

С целью выявления субклеточной локализации свертывающего и антикоагуляционного потенциала клеток сердца и печени и динамики их изменений в условиях воздействия каротин-содержащих растительных масел, нами было проведено исследование тромбопластиновой, антигепариновой и антитромбиновой активности в митохондриях, микросомах /саркоплазматическом ретикулуме/, цитозоле и наружных мембранах миокардиоцитов и гепатоцитов интактных крыс и животных, получавших бета-каротинсодержащие масла перорально в вышеприведенных дозах. По нашим данным наибольшей тромбопластиновой и антигепариновой активностью в клетках печени интактных животных обладают митохондрии и микросомы, а в клетках сердца — микросомы и митохондрии /определение по времени свертывания контрольной бестромбоцитарной и гепаринизированной субстратной плазмы/. Так, под влиянием митохондрий печени и сердца время свертывания бестромбоцитарной субстратной плазмы сокращалось на 32 % и 52 %, а тромбиновое время гепаринизированной плазмы укорачивалось, соответственно, на 35% и 52 %. Микросомы сокращали время рекальцификации субстратной плазмы на 27 %, а саркоплазматический ретикулум — на 56 %. Тромбиновое время гепаринизированной субстратной плазмы под их влиянием укорачивалось соответственно, на 39% и 42 %.

Плазматическая мембрана гепатоцитов проявляла невыраженную тромбопластиновую активность и не оказывала антигепаринового действия. Время свертывания бестромбоцитарной субстратной плазмы уменьшалось на 11 %, составляя $118 \pm 4,3$ секунд против 132 ± 15 секунд в контроле.

Тромбобластиновое и антигепариновое действие сарколеммы также проявляется незначительно, а в цитоплазматической фракции тромбопластиновое и антигепариновое влияние вообще не обнаружено. В то же время цитозоль и наружные мембраны клеток сердца и печени оказывали антикоагулянтное действие на субстратную плазму. Тромбиновое время плазмы под их влиянием удлинялось на 100 % и 66 % при действии цитозольной фракции и на 53 и 27 % при действии наружных мембран миокардиоцитов и гепатоцитов.

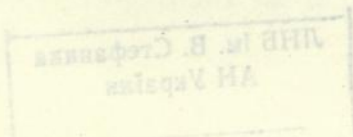
Митохондрии и микросомы клеток печени, обладающие в норме высокой тромбопластиновой и антигепариновой активностью, не проявляют антикоагулянтные свойства. Цитозольная фракция, наоборот, оказывает антикоагулянтное действие, но не обладает свертывающим потенциалом. Наружная мембрана гепатоцитов проявляла антикоагулянтное действие, слабое тромбопластиновое влияние и не обладала антигепариновыми свойствами.

Митохондрии и саркоплазматический ретикулум клеток сердца в норме оказывали выраженное тромбопластиновое и антигепариновое действие, сарколемма — слабое коагулирующее действие. Антикоагулянтными свойствами обладали лишь цитозольная фракция и сарколемма. Курсовое применение каротиносодержащих растительных масел не вызывало значительных достоверных изменений тканевых факторов свертывания, которые могли бы свидетельствовать об изменении их содержания или о перераспределении их локализации в субцелочных структурах.

Известно, что начальная стадия свертывания крови во многом зависит от липидных компонентов тромбопластинов — фосфолипидов, липид-липидным взаимоотношениям между их функционально различными группами / К.Г.Карагезян, и соавт., 1974/. Учитывая существование метаболической связи между холин-, этаноламино- и серин-содержащими фосфатидами и определяющее значение характера их взаимоотношения на проявление прокоагулянтной активности / С.О.Овакмян, К.Г.Карагезян, 1978/, нами был исследован фосфолипидный состав наружных мембран клеток печени и сердца, так как именно эти мембраны имеют самое непосредственное отношение к тромбопластиновой активности тканей. Изучали содержание фосфатидилхолина, фосфатидилэтанолamina, фосфатидилсерина, холестерина, а также продуктов распада фосфолипидов — лизоформ и свободных жирных кислот в наружных мембранах клеток этих органов. В плазматической мембране гепатоцитов оказалось 28,7 % фосфатидилхолина, 2,9 % фосфатидилэтанолamina, 1,74 % фосфатидилсерина, 39,4 % холестерина, 26,4% свободных жирных кислот, 0,9 % лизофосфолипидов. В сарколемме — оказалось 1,74 % фосфатидилсерина, 25,0 % фосфатидилхолина, 47,5 47,5 % холестерина, 25 % свободных жирных кислот и 25 % лизофосфолипидов. Введение каротинсодержащих масел не приводило к существенным изменениям соотношения изучаемых фракций липидов в мембранах. Поэтому изменения их проницаемости, изученные позднее при помощи меченого кальция, являются функциональными и не связаны с достоверным изменением жирнолипидного состава мембран.

Нами была также изучена скорость пассивного транспорта ионов кальция из везикул мембран клеток сердца и печени, предварительно нагруженных радиосактивным кальцием. Необходимость таких экспериментов объяснялась тем, что изменения тканевых факторов свертывания под влиянием этилового алкоголя могут быть следствием нарушения выхода субстанций с про- и антикоагулянтной активностью, как результат изменения проницаемости клеточных мембран. Результаты этой серии исследований приведены на рисунке В в условиях контрольных опытов и к концу первой минуты инкубации из везикул мембран миокардиоцитов и гепатоцитов выходит соответственно 30 и 26 % исходного содержания кальция, а остальное его количество выходит постепенно, плавно снижаясь по мере уменьшения градиента концентрации ионов кальция.

Сравнительное изучение проницаемости наружных мембран клеток обоих органов показало, что если в условиях иммобилизационного стресса выявляется выраженный дестабилизирующий эффект на мембрану, при этом резко повышается проницаемость ее для ионов кальция, то у животных, которым вводили с лечебно-профилактической целью бета-каротинсодержащие масла, усиление проницаемости менее значительно. Сдвиги проницаемости мембран в сторону их снижения можно расценивать как положительную защитную реакцию организма, которая оптимизируется каротин-содержащими маслами.



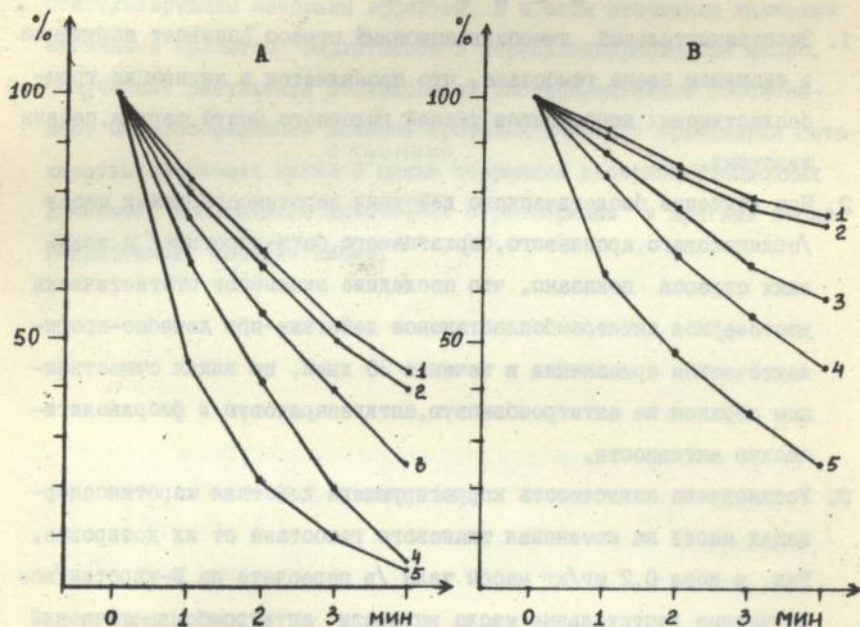


Рисунок . Пассивный транспорт $^{45}\text{Ca}^{2+}$ через везикулы наружных мембран миокардиоцитов и гепатоцитов и его изменения под действием каротинсодержащих растительных масел

A — сарколемма миокардиоцитов

B — плазматическая мембрана гепатоцитов

1 — крысам вводили бархатцевое масло с содержанием бета-каротина 0,002 мг/кг, перорально в течение 20 дней

2 — вводили черноплоднорябиновое масло

3 — вводили облепиховое масло

4 — вводили масляный раствор бета-каротина микробиологического из расчета 0,002 мг/кг, перорально в течение 20 дней

5 — интактные животные

ВЫВОДЫ

1. Экспериментальный иммобилизационный стресс вызывает нарушения в тканевом звене гемостаза, что проявляется в активации тромбопластиновых компонентов тканей головного мозга, сердца, печени животных.
2. При изучении биологического действия каротинсодержащих масел /облепихового, арониевого, бархатцевого, бета-каротина/ в условиях стресса показано, что последние оказывают статистически достоверное антитромбопластиновое действие при лечебно-профилактическом применении в течение 20 дней, не влияя существенным образом на антитромбиновую, антигепариновую и фибринолитическую активности.
3. Установлена зависимость корректирующего действия каротинсодержащих масел на изменения тканевого гемостаза от их дозировки. Так, в дозе 0,2 мг/кг массы тела /в пересчете на В-каротин/ все изученные растительные масла вызвали антитромбопластический эффект, в то время как в дозе 0,002 мг/кг массы он проявлялся только при введении черноплоднорябинового и бархатцевого масел, что подчеркивает их большее биологическое действие.
4. Антитромбопластиновый эффект, как показали результаты исследований, не зависел от вида масляного экстрагента /подсолнечное, соевое, кукурузное, оливковое масло/, а был обусловлен химическим составом исходного сырья /облепиха, черноплодная рябина, бархатцы распростертые/. Поэтому получение бета-каротинсодержащих масел с высокой биологической активностью можно осуществлять, используя различные вышеперечисленные растительные масла.
5. Результаты изучения пассивного транспорта Ca^{45} ²⁺ через везикулы наружных мембран миокардиоцитов и гепатоцитов свидетельствуют о том, что бета-каротинсодержащие растительные масла обладают

стабилизирующим мембраны эффектом, и в этом отношении наиболее активными являются бархатцевое и черноплоднорябиновое масло.

6. Полученные результаты исследований экспериментально обосновывают целесообразность лечебно-профилактического применения бета-каротинсодержащих масел с целью коррекции гиперкоагуляционных изменений в организме, вызываемых стрессорными и другими неблагоприятными воздействиями.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оценка унифицированных показателей свертывающей системы крови при курсовом применении облепихового масла // 1У научный съезд специалистов по клинической лабораторной диагностике Республики Беларусь: Тезисы докладов. - г. Гродно, 1992. - С. 173-175.
2. К вопросу об унификации методов определения фибринолитической активности крови // 1У научный съезд специалистов по клинической лабораторной диагностике Республики Беларусь: Тезисы докладов. - Г.Гродно, 1992. - С. 152-154 / соавт. Липкан Г.Н., Гетте З.П., Каменецкая Т.И. и др. /
3. Значение изучения тромбопластиновой активности тканей при оценке действия физиологически активных веществ на систему гемостаза // Третя українська конференція з медичної ботаніки: Тези доповідей. - Київ. - 1992. - Ч. 1. - С. 91. /соавт. Липкан Г.Н., Махмутова Л.М., Иваненко Т.В. /

Подп. к печ. 25.03.93. Формат 80×84/16 Бумага офс.
Печ. офс. Усл. печ. л. 4,3 Уч.-изд. л. 1 Тираж 100.
Зак. 3-3275

Киевская книжная типография научной книги. Киев, Репина, 4.

AB 27.023