

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ
ТА ТОКСИКОЛОГІЇ

На правах рукопису

КАСЬЯНОВА Олена Володимирівна

ВПЛИВ ЛІПОСОМ НА ПОКАЗНИКИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ
ЛІПІДІВ І ЕНЕРГЕТИЧНИЙ МЕТАБОЛІЗМ ПРИ СТРЕСІ

03.00.04 - біохімія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1993

Робота виконана в Інституті біохімії ім. О.В.Палладіна АН України

Науковий керівник - д.б.н. Стефанов О.В.

Офіційні опоненти: д.б.н. Левицький Є.Л.
д.м.н., проф. Кресюн В.Й.

Провідна установа: Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця АН України

Захист відбудеться 22 вересня 1993 р. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 088.19.01 в Українському Інституті фармакології та токсикології МОЗ України (252057, Київ, вул. Ежена Потье, 14).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотечі Українського Інституту фармакології та токсикології МОЗ України

Автореферат розісланий _ _ _ _ 1993 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
доктор медичних наук,
професор

В.С.Даниленко

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00754012 (J)

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

Актуальність роботи, дослідження основних біохімічних процесів, які викликають необоротні процеси при тривалому стресі та пошук перспективних лікарських засобів, які корегують стресорні порушення, є актуальною проблемою біохімії та медицини. Це зумовлено збільшенням в усьому світі кількості неінфекційних захворювань, у виникненні та розвитку яких важливу, а іноді і вирішальну роль відіграє стрес-реакція.

Як відомо, стрес є неспецифічним компонентом фізіологічних та патологічних реакцій. Стрес-пошкодження мають детермінований механізм розвитку. Провідна роль у цьому процесі належить катехоламінам та котрикостероїдам, які ініціюють активацію перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). Також чітко встановлено, що ПОЛ - один з найбільш сильних модифікаторів біологічних мембран. Сумарний ефект накопичення продуктів ПОЛ, енергодефіциту та порушення транспорту кисню зумовлює комплекс змін, що призводять до різкого пошкодження структури та функції клітини, останньою стадією якого є загибель.

Участь у патогенезі стресорних пошкоджень багатьох пов'язаних між собою причинно-наслідкових факторів пояснює значну кількість засобів, що з більшим чи меншим успіхом застосовуються для профілактики та лікування стресорних пошкоджень органів. Однак, використання більшості з них не дозволяє розірвати коло метаболічних порушень, що розвиваються, певно, через вузько спрямовану дію на одну з ланок процесу. Крім того, практично усі препарати значно ефективніші при введенні до початку дії стресорного фактора, ніж на тлі розвитку стрес-реакції. Тому актуальним є ширший підхід до фармакологічного захисту органів при стресі.

На нашу думку для підвищення резистентності організму до стресорної дії, що триває, необхідне одночасне дотримання кількох умов, серед яких найважливіше місце посідають: інгібування ПОЛ; відновлення енергозабезпеченості тканин; підвищення швидкості дифузії кисню через біологічні бар'єри.

Цілком зрозуміла необхідність не тільки профілактичної дії на організм (що не завжди можливо), але й постстресорної лікувальної дії,

спрямованої на обмеження та гальмування стресорних пошкоджень.

Раніше було доведено, що використання фосфатиділхолінових (ФХ) ліпосом при гіпоксичних станах різної етіології призводить до вираженого антигіпоксичного та антиоксидантного ефекту. Водночас ФХ ліпосоми є малотоксичними, біодеградуєчими, а продукти їх розпаду легко утилізуються в організмі, включаючись в обмінні процеси.

У зв'язку із зазначеним вище стає зрозумілою актуальність розробки препаратів різних термінів введення і спрямованості на різні стадії процесу в умовах довготривалого стресу.

Мета та завдання дослідження. Метою даної роботи було експериментальне вивчення можливості корекції пошкоджуючої дії продуктів перекисного окислення тканин та порушень енергетичного обміну за допомогою фосфатиділхолінових ліпосом на різних стадіях гострого стресу та дати її біохімічне обґрунтування.

Для вирішення цих питань були поставлені такі задачі :

1. Дослідити вплив ФХ ліпосом на рівень накопичення первинних та вторинних продуктів ПОЛ у тканинах мозку, серця, печінки, легенів і крові в умовах іммобілізаційного стресу.
2. Вивчити вплив ліпосом на стан антиоксидантних систем організму при стресі.
3. Оцінити вміст основних макроергічних сполук після перенесеного стресу на тлі введення ФХ везикул.
4. Вивчити вплив ФХ ліпосом на показники, що характеризують кисневе постачання організму.
5. Вивчити вплив ФХ ліпосом на функціональну активність та електричну стабільність міокарда при стресі.

Наукова новітність. У роботі вперше використаний підхід комплексного впливу на процеси перекисного окислення ліпідів та рівень основних макроергічних сполук, які, на нашу думку, є вирішальними та взаємозумовлюючими факторами при розвитку стресорних пошкоджень.

Активация процесів ПОЛ викликає зміни жирнокислотного складу фосфоліпідів клітинних мембран та їх проникності. Порушення структурної організації мітохондріальних мембран призводить до роз'єднання процесів окислювального фосфорилування і, звичайно, до гальмування синтезу макроергічних сполук. Крім того, нами з'ясовано, що підвищення проникності мембранних бар'єрів викликає розвиток інтерстиціального набряку, що не тільки подовжує дифузійний шлях кисню як з альвеолярного повітря у кров, так й з крові у тканини, але і значно знижує коефіцієнт його дифузії. Це, у свою чергу, погіршує кисневе забезпечення організму, призводить до накопичення недоокислених продуктів, зменшення продукції провідних макроергів, вторинної активації процесів ПОЛ, і порочне коло стресорних пошкоджень замикається.

На кожному етапі розвитку стрес-реакції функціонують відповідні компенсаторні механізми, що намагаються стабілізувати тканинний метаболізм. Але при тривалому стресі, як показано, тільки комплексний вплив на процеси ПОЛ та енергообмін дозволяє розімкнути порочне коло та попередити стадію необоротних порушень.

Одержані нові дані, які свідчать про те, що ФХ ліпосоми, введені тваринам на фоні іммобілізаційного стресу, викликають інгібування процесів ПОЛ, сприяють підтримуванию функціональної активності як ферментативної, так і неферментативної антиоксидантних систем. При введенні ФХ ліпосом тваринам, що зазнали стресорної дії, виявлені односпрямовані і залежні від дози зниження вмісту продуктів ПОЛ, підвищення глутатіонпероксидазної активності і рівня відновленого глутатіону.

Вперше доведено, що ліпосоми при стресі виявляють антигіпоксичний ефект, попереджують зниження енергозабезпеченості кардіоміоцитів та гепатоцитів.

Вперше виявлено запобігання стресорних порушень серцевого ритму ФХ ліпосомами.

Практична цінність роботи. Результати досліджень, наведені в роботі, дозволяють припустити, що ліпосоми, введені на різних етапах стресу, мають пряму чи непряму дію на найважливіші ланки у ланцюгу стресорних пошкоджень.

Клінічні дослідження препарату ЛІПІН, який створено на основі ФХ ліпосом, підтвердили його високу ефективність при гіпоксичних станах різної етиології. Наші дослідження є основою для експериментального обґрунтування розширення показань до застосування препарату при цілому ряді захворювань неінфекційної природи, в етиології яких суттєва роль належить гострому стресу.

Основні положення роботи, що виносяться на захист:

1. Фосфатиділхолінові ліпосоми при іммобілізаційному стресі справляють генералізований антиоксидантний ефект на організм.

2. Інгібування процесів ПОЛ ФХ ліпосомами забезпечується за рахунок підтримання антиоксидантного статусу ферментативної системи та рівня ендогенних антиоксидантів.

3. Вивчена дозозалежна дія ліпосом на показники ПОЛ. ФХ ліпосоми в умовах іммобілізаційного стресу справляють антиоксидантний ефект, підтримують енергозабезпеченість міокарда і печінки, запобігаючи розвитку лактат-ацидозу при одноразовому внутрішньочеревному введенні в дозі 5-10 мг на 100 г ваги.

4. Використання екзогенних фосфоліпідів на тлі стресу сприяє більш рівномірному перебігу процесу газообміну в різних ділянках легенів за рахунок значного підвищення швидкості дифузії кисню через біологічні бар'єри.

5. При експериментальному інфаркті міокарда після перенесеного стресу введення фосфоліпідів попереджувало порушення електричної стабільності серця та розвиток аритмії.

Апробація роботи. Матеріали роботи були представлені та доповідались на

спільному засіданні лабораторій Інституту біохімії АН України у 1991 році, на Всесоюзному симпозиумі "Стрес, адаптація та дисфункція" (Кишинів, 1990), на 4 Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992), на Донецькій обласній науковій конференції (Донецьк, 1991).

Публікації. На тему дисертації опубліковано 6 наукових робіт.

Обсяг та структура роботи. Дисертація викладена на сторінках друкованого тексту та складається із вступу, чотирьох розділів власних досліджень, висновку, списку використаних літературних джерел з найменувань. Ілюстративний матеріал подано у 5 таблицях і 17 малюнках.

Матеріали та методи досліджень. На основі аналізу літературних даних (Ф.З. Меерсон і т. д., 1981; Н.В. Гуляева, 1989), моделлю гострого стресу, що викликає необоротні пошкодження, було обрано іммобілізаційний стрес тривалістю 6 годин.

Дослідження виконано на 490 пацюках-самцях лінії Вістар вагою 150-280 г, що утримувалися в стандартних умовах віварію, у 7 серіях експериментів. Іммобілізаційний стрес у тварин моделювали за Г.Сельє (1977) шляхом жорсткої фіксації за 4 кінцівки на спині протягом 6 годин у відповідності з правилами проведення наукових досліджень з використанням експериментальних тварин, затвердженими Президією АН СРСР 2 квітня 1980 року, N12000-496. Першу та другу групу склали інтактні тварини та тварини, що перенесли 6-годинний стрес. Тваринам цих груп робили контрольну ін'єкцію фізіологічного розчину.

Виявлення ефективної діючої дози ФХ ліпосом проводили у 3 серіях на 3 групах тварин, яким ліпосоми вводили внутрішньочеревно у дозах 2,5; 5,0; 10,0 мг на 100 г ваги тварини через 4 години після початку стресорної дії.

У 4 серії для вивчення рівня накопичення продуктів ПОЛ у залежності від часу введення ліпосом тр. групам тварин

внутрішньочеревно вводили фосфоліпіди через 2, 4, 6 годин після початку стресорної дії. Ліпосоми вводили у дозі 10 мг на 100 г ваги.

Після з'ясування ефективних доз та часу введення дослідження впливу ФХ ліпосом на інтенсивність процесів ПОЛ та рівень макроергічних сполук проводили на групі з 20 тварин (5 серія), яким вводили ліпосоми у дозі 10 мг на 100 г ваги через 4 години після початку стресорної дії.

Об'єм суспензій, які вводили у всіх групах, - 0,2 мл на 100 г ваги.

Після закінчення експериментів тварин декапітували. Контрольних тварин забивали в умовах, що виключають вплив стресорних факторів (Ф.З. Меерсон, 1986). Тканини серця, печінки, легенів та мозку заморожували безпосередньо у грудній клітці шпильками Волленберга та фіксували у рідкому азоті. Зібрану після декапітації кров швидко охолоджували до 0-5°C.

У додаткових 6 та 7 серіях експериментів по вивченню електрофізіологічних та об'ємно-часових характеристик зовнішнього дихання та газо-зміну тварин після 6 годинної іммобілізації наркотизували (5 мг хлоралози, 50 г уретану на 100 г ваги, внутрішньочеревно). Через 30 хвилин у сонну артерію вводили фосфоліпідні везикули у дозі 2,5 мг на 100 г ваги (Меерсон Ф.З., 1984; Пожаров В.П., 1990).

Вираженість стресу з'ясовували за ульцерогенним впливом на слизову оболонку шлунку, враховуючи частоту та кількість уражень.

Для вирішення поставленої задачі нами були використані препарати ФХ ліпосом, одержані за яєчного лецитину диспергуванням у фізіологічному розчині з подальшою ультразвуковою обробкою за допомогою дезінтегратора типу УЗДН Т2 (А.В. Стефанс, а.с. 1424167 СРСР).

Такі фосфоліпідні ліпосоми ідентичні за складом та фізико-хімічними характеристиками з препаратом ЛППН, який випускається з 1992 року Харківським підприємством з виробництва бакпрепаратів.

Наважки мозку, серця, легенів та печінки для визначення активності ферментів гомогенізували в 10 об'ємах буферної суміші, яка містила 0,025

М трис HCl , 0,175 М KCl , 0,001 М EDTA (рН 7,4). Гомогенати при 0°C центрифугували 30 хвилин при 18 тис. обертів/хв. Надосадову рідину використовували як джерело ферментів.

Вміст первинних продуктів ПОД дієнових кон'югатів визначали в екстрактах хлороформметанольної суміші (2:1) УФ-спектрофотометричним методом при 233 нм (Stoffel et al., 1958). Рівень вторинних продуктів ПОЛ оцінювали за реакцією з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) спектрофотометрично при довжині хвилі 532 нм (Н. Chkawa, 1979) з наступним перерахунком на кількість малонового діальдегіду (МДА). Активність СОД визначали за зниженням інтенсивності аутоокислення адреналіну в адренохром, вміст якого визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 480 нм (Н. Mirza, 1972). Активність каталази визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 249 нм (М.А. Коралюк, 1988). Глутатіонпероксидазну активність визначали спектрофотометрично за кількістю вільного глутатіону, окисленого в процесі аеробної інкубації. Активність глутатіонредуктази окисленого глутатіону визначали за зменшенням НАДФН, що рееструвалося при довжині хвилі 340 нм.

Активність ферментів перераховували на мг білка. Концентрацію білка визначали за Лоурі (1951).

Стан неферментативної антиоксидантної системи оцінювали: за рівнем ендогенного антиоксиданта α - токоферола, визначеним флуориметрично з максимумом збудження при 295 нм та максимумом флуоресценції при 340 нм (Р.Ш. Киселевич, С.Н. Скварко, 1972); За рівнем відновленого глутатіону, що визначається за кольоровою реакцією тіолових груп з 5,5-дітіобіс-2-нітробензойною кислотою спектрофотометрично при довжині хвилі 412 нм.

Кількість основних макроергів - АТФ, АДФ, АМФ та креатинфосфату і концентрацію лактата визначали за допомогою наборів фірми Boehringer Mannheim в безбілкових екстрактах тканин.

Енергетичний заряд системи розраховували за формулою, яку запропонував Аткінсон: Енергетичний заряд = $0.5 (\text{АДФ} + 2\text{АТФ}) /$

(АМФ+АДФ+АТФ)

Статистичну обробку результатів проводили за стандартними програмами.

Показники зовнішнього дихання та газообміну, рН крові визначали на мікроаналізаторі типу СР-215 (Угорщина), обладнаному датчиком фірми RADIOMETER (Данія). Дифузійну здатність легень вимірювали за Д. Піппером та ін., 1969. Відповідність доставки кисню до тканин фактичному його споживанню оцінювали шляхом розрахунку на основі результатів газоаналізу та рН крові (К. Talafin, 1984).

Визначення порогу фібриляції шлуночків та електричної стабільності серця при експериментальному інфаркті міокарда проводили за методикою, розробленою Ф.З. Меерсоном та ін., 1984.

Результати та обговорення. Початковий етап роботи становив оцінку важкості стресорних пошкоджень після 6-годинної іммобілізації на спині. При цьому виникали стресорні виразки, які були показниками стресорної реакції. За літературними даними, частота виразок у пацієнтів, що викликаються 6-годинною іммобілізацією, дорівнює 70-80% (Меерсон, 1988).

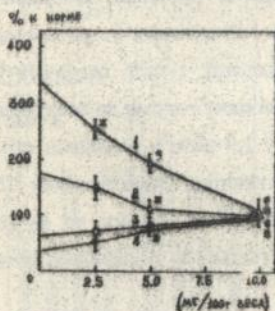
Нас привабила ця модель тому, що виразка шлунку, яка з'являється у тварин в результаті штучно викликаного неврозу (стресу), на думку різних авторів за своїм походженням найближче стоїть до виразок шлунку у людини при нейрогенних формах виразкової хвороби (С.В. Анічков, 1969).

а спрямованість метаболічних пошкоджень внаслідок активації ПОЛ та енергодефіциту носить необоротний характер (Н.В. Гуляева, 1969).

Дійсно, в наших експериментах після 6-годинної іммобілізації на спині у 70% тварин розвивалися виразки слизової оболонки шлунку. Після введення ФХ ліпосом кількість експериментальних тварин з виразками шлунку зменшилась майже у 5 разів, середня кількість виразок на один шлунок - у 2,7 рази, а середня довжина виразок - у 3 рази.

Раніше було показано, що при гіпоксичній гіпоксії ліпосоми виявляли виразний антиоксидантний ефект при внутрішньовенному чи інтратрахеальному способі введення у дозі 2,5 мг на 100 г ваги (С.А. Бригінський та ін., 1986). На моделі іммобілізаційного стресу була досліджена дія фосфоліпідів у дозі від 2,5 до 10.0 мг на 100 г ваги тварини при внутрішньочеревному введенні через 4 години після початку 6-годинної іммобілізації. Як критерії ефективності антиоксидантної дії доз введеного препарату було обрано такі показники: вміст первинних та вторинних продуктів ПОЛ, активність ферментативної та неферментативної антиокислювальних захисних систем у тканині міокарда (мал. 1). Інтегральною характеристикою антиоксидантного статусу організму було обрано співвідношення рівня відновленого глутатіону (ГSH) та активності глутатіонпероксидази (ГПО).

Як видно з мал. 1, введення фосфоліпідів ліпосом пащокам на фоні стресорного впливу вже у дозі 5 мг на 100 г ваги викликає падіння вмісту ДК та МДА на 83 і 60%. Характерно, що ліпосоми виявляють упереджуючу, інгібуючу дію на рівень накопичення гідроперекисів, тобто на початкову стадію активації ПОЛ. При цьому фосфоліпіди суттєво підвищували



Мал. 1 Зміни показників ПОЛ у міокарді в залежності від дози введених ліпосом при стресі.

- 1.-МДА
- 2.-ДК
- 3.-відновлений глутатіон
- 4.-глутатіонпероксидаза

*Вірогідність відмін в порівнянні із стресом без ліпосом.

ефективність глутатіонзалежної антиокислювальної системи організму. Активність ГПО підвищувалась на 70% при сталій тенденції до росту рівня

GSH. Найбільш ефективним було введення препарату у дозі 10 мг на 100 г ваги за 2 години до відміни стресорної дії. У цьому випадку рівень ПОЛ знижувався практично до контрольних величин.

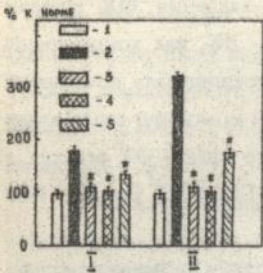
Таким чином, фосфоліпіди ліпосоми виявляють захисну антиоксидантну дію в залежності від дози введеного препарату: менш ефективне введення у дозі 2,5 та 5,0 мг на 100 г ваги, найбільш ефективне - у дозі 10 мг на 100 г ваги.

Співвідношення про- та антиоксидантних агентів ПОЛ при стресі та на тлі введення ФХ ліпосом у обраній дозі визначали за швидкістю спонтанного та Fe-аскорбатзалежного ПОЛ у гомогенатах печінки та серця.

Введення ліпосом на тлі стресу викликало у тканинах печінки та міокарду інгібування спонтанного ПОЛ на 88% та 90 % , Fe - аскорбатзалежного - на 85% та 95% відповідно.

З літературних джерел відомо, що в залежності від стадії розвитку стресу у тварин виявлені фазні різноспрямовані зміни показників окислювальної та антиокислювальної систем організму (Гуляєва Н.В., 1988). Час накопичення продуктів ПОЛ у крові та життєво важливих органах передре періоду необоротних порушень гомеостазу клітини та її наступної загибелі.

Як свідчать дані , представлені на мал.2, ліпосоми зменшували кількість продуктів ПОЛ (як первинних, так і вторинних) при введенні через 2 , 4 та 6 годин після початку іммобілізації. Навіть введення ФХ ліпосом у момент зняття іммобілізації, тобто за одну годину до декапітації, сприяло зниженню рівня ДК у 1,3 та МДА у 1,9 рази у найбільш стрес-пошкодженій тканині міокарду. Але найефективніша корекція рівня ПОЛ була відзначена після введення препарату за 2 та 4 години до відміни стресорного впливу. Вірогідно, що цей час збігається із стадією первинної активації ПОЛ.



Мал. 2 Склад продуктів ПОЛ в міокарді в залежності від часу введення ліпосом при стресі

1.- контроль

2.- стрес 6 годин

3.- введення через 2 години після початку стресу

4.- введення через 4 години після початку стресу

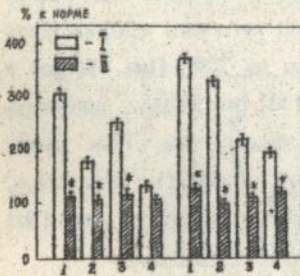
5.- введення через 6 годин після початку стресу

*Вірогідність відмін в порівнянні із стресом без ліпосом

Введення ФХ ліпосом контрольним тваринам не впливало на рівень накопичення продуктів ПОЛ та відповідало біохімічним характеристикам тварин з контрольною ін'єкцією фізіологічного розчину.

На наступному етапі дослідження здалося доцільним оцінити захисний ефект ФХ ліпосом у тканинах з різною чутливістю до стресу.

Після внутрішньочеревного введення фосфоліпідів на тлі розвитку стресорної реакції у тканинах серця, легень та печінки цілком певного збільшення кількості первинних та вторинних продуктів ПОЛ не було (мал.3). Рівень ДК та МДА у крові перевищував контрольні значення лише



Мал. 3. Вплив ліпосом на вміст продуктів ПОЛ у різних органах

1.-кров I- стрес

2.-серце II-стрес+ліпосоми

3.-печінка

4.-мозок

I-Дієг'єві кон'югати

II-МДА

*Вірогідність відмін в порівнянні із стресом без ліпосом

на 21 % та 39% у порівнянні з дво-, трьохкратним підвищенням при стресі без корекції. При цьому у головному мозку введення ФХ ліпосом нормалізувало рівень первинних продуктів ПОЛ- ДК, але концентрація МДА у післястресорний період все ж на 20% перевищувала початковий рівень. Антиоксидантна дія ФХ ліпосом у тканині мозку при стресі може бути, на нашу думку, результатом генералізованого ефекту ФХ везикул, а також, можливо, наслідком зміненої проникності ГЕБ (Т.І. Белова , 1988).

Таким чином, використання ліпосом призводило до зниження рівня первинних та вторинних продуктів ПОЛ практично в усіх вивчених тканинах.

Як відомо, загальний рівень продуктів ПОЛ визначається співвідношенням швидкостей утворення токсичних продуктів та їх утилізації (М.В. Біленко ,1989; G. Conen ,1984)

Введення ліпосом на тлі стресу сприяло відновленню активності СОД, що обмежує утворення вільних форм кисню, на 25%-35%. Одночасно активність каталази, яка розщеплює токсичні гідроперекиси, у порівнянні з аналогічними показниками при стресі без корекції збільшилася на 80% у серці, 46% у печінці та мала тенденцію до зростання у мозку та крові.

Треба відзначити, що характер змін активності ферментів глутатіонпероксидази - глутатіонредуктази при іммобілізаційному стресі у залежності від типу тканини є різноспрямованим. Активність ГПО у крові та серці знижується на 60%-65% на тлі менш суттєвого падіння рівня ендogenous антиоксиданту ГSH - приблизно на 30%. Пул ГSH, що є донором електронів та активним центром ГSH-пероксидаз, підтримує глутатіонредуктазу, активність якої дещо збільшується. При цьому активність ГПО у постстресорний період у мозку не тільки не знижується, але й має тенденцію до зростання на тлі практично початкового рівня ГSH та 25% зниження активності ГР.

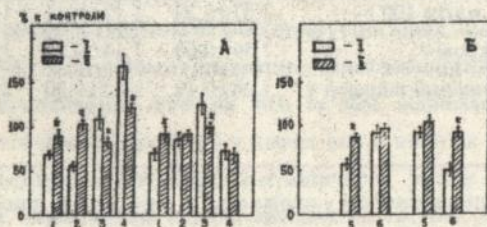
Введення ФХ ліпосом на тлі стресу зазвичай зпечувало високу антиокислювальну активність глутатіонзалежних ферментів. У печінці та

серці досліджувані показники практично відповідали контрольним числам, у крові констатували 70% відновлення активності ГПО. При цьому у тканині мозку після введення ФХ ліпосом на тлі відновлення активності ГПО до стаціонарного рівня активність ГР мала тенденцію до зниження вірогідно за рахунок активації пула GSH, що підтримує антиокислювальну активність ГПО.

У той же час спостерігалось обмеження падіння кількості ендогенних антиоксидантів GSH та токоферола переважно у печінці та головному мозку (мал.4).

Таким чином, ФХ ліпосоми здійснюють генералізований захисний антиоксидантний ефект на організм. В його основі є, вірогідно, інгібування первинного посилення ПОЛ у ендотелії мілких судин та капілярів клітинних елементів крові, що узгоджується з останніми літературними повідомленнями.

Антиоксидантний ефект ліпосом може бути частково пояснений прямим неферментативним інгібуванням ПОЛ за рахунок екзогенно введеного ФХ, який має антиоксидантні властивості. Певно, ще більш вірогідна сорбція на ліпосомах сполук ліпідної природи - продуктів ПОЛ з подальшим транспортуванням їх на цитохром Р- 450 - залежну систему монооксидаз печінки, яка здійснює метаболізацію їх нерадикальним пероксидазним методом. Таке уявлення знаходиться у відповідності зі



Мал. 4 Вплив ліпосом на показники ферментативної (А) і неферментативної

(Б) антиоксидантних систем у тканинах шурів при стресі.

I стрес	II стрес+ліпосоми
1- СОД	4- глутатіонредуктаза
2- каталаза	5- глутатіон відновлений
3- глутатіонпероксидаза	6- -токоферол

*Вірогідність відмін в порівнянні із стресом без ліпосом

з'ясованою нами з лісною дією ФХ при внутрішньочеревному способі введення ліпосом, які елімінуються з плазми крові і потрапляють у печінку.

Після перенесеного стресу відбувається переключення метаболізму на анаеробний шлях, про що свідчать артеріальна гіпоксемія, падіння споживання кисню, декомпенсований метаболічний ацидоз, що супроводжується 40%` зниженням дихального об'єму і 60%` зниженням дифузійної здатності легенів.

Таблиця 1

Вплив ліпосом на показники, що характеризують кисневе постачання організму при стресі ($M \pm m$)

Внутрішньовенне введення у дозі 2,5 мг/ 100 г ваги

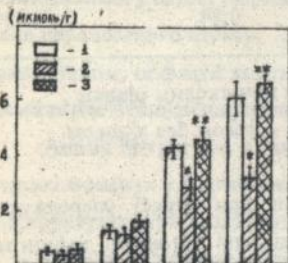
Показники	Контроль	Стрес	Стрес+ліпосоми
Напруга O в артеріальній крові, гПа	116 \pm 2	89 \pm 4	104 \pm 5*
Споживання O ,мл/хв 100 г	2,57 \pm 0,29	1,13 \pm 0,11	1,54 \pm 0,15**
pH артеріальної крові	7,39 \pm 0,60	7,14 \pm 0,20	7,21 \pm 0,01
Концентрація молочної кислоти у крові, ммоль/л	2,06 \pm 0,19	5,02 \pm 0,30	2,31 \pm 0,52*

Прим. * - вірогідні відмінності у порівнянні зі стресом без ліпосом;

** - вірогідні відмінності у порівнянні з контролем і стресом без ліпосом.

Після введення ліпосом дифузійна здатність легень при стресі збільшувалась на 44%. Про нормалізацію функції легень при введенні ліпосом свідчить також різке підвищення ефективності та економічності зовнішнього дихання, яке відображається у підвищенні хвилинного та дихального об'ємів.

Сукупність відзначених змін у легенях, печінці, міокарді під впливом ліпосом призводила, кінець кінцем, до поліпшення дифузійних параметрів для кисню при переході з крові у тканини та нормалізації співвідношень між аеробним та анаеробним метаболізмом, про що свідчило зменшення ступеня лактат-ацидоза у два рази.



Мал. 5 Зміни вмісту макроергічних сполук в серці шурів при введенні ліпосом на тлі стресу.

1- контроль

2- стрес

3- стрес + ліпосоми

*- Вірогідність відмін з початковим рівнем

** - Вірогідність відмін у порівнянні із

стресом без ліпосом.

Безпосереднім результатом переключення метаболізму клітини на аеробний шлях є відновлення енергозабезпеченості тканин. Як показано, в результаті введення ліпосом на фоні стресу спостерігалося 5% підвищення кількості КФ у гепатоцитах та двократне у кардіоміоцитах при одночасному зростанні концентрації АТФ на 50% та 80% відповідно. Підвищення енергетичного статусу організму у наших експериментах підтвержувалося також збереженням сумарного енергетичного заряду клітин, що за Аткінсоном, характеризує ступінь заповнення системи АТФ-АДФ-АМФ високоенергетичними фосфатними зв'язками.

Вплив ліпосом на енергетичний заряд системи АТФ-АДФ-АМФ при стресі

Стан	Енергетичний заряд, ум. од.	
	кардіоміоцити	гепатоцити
Контроль	0,85	0,86
Стрес	0,80	0,70*
Стрес+ліпосоми	0,84	0,83**

Прим. * - вірогідні відмінності у порівнянні з початковим рівнем ;

** - вірогідні відмінності у порівнянні зі стресом без ліпосом.

Таким чином, фосфатиділхолінові ліпосоми при стресі упереджують порушення метаболізму аденілових нуклеотидів, які зумовлені дифіцитом кисню.

Як відомо, в результаті стресорного впливу найчастіше виникають порушення функціональної активності міокарда (Ф.З. Меерсон, 1986). І дійсно, зниження енергозабезпеченості кардіоміоцитів і порушення генерації та проведення нервового імпульсу у цьому органі, що зумовлене активацією ПОЛ, реалізується у порушеннях серцевого ритму, тобто у виникненні аритмій та фібриляцій, що є однією з головних причин загибелі при стресі.

Експерименти, виконані спільно з співробітниками лабораторії патофізіології серця під керівництвом професора Ф.З. Меерсона (РАМН, НДІ загальної патології та патологічної фізіології) показали, що ФХ ліпосоми при експериментальному інфаркті міокарда після перенесеного стресу у 2 рази збільшували поріг фібриляції шлуночків серця.

Згідно існуючих уявлень це означає, що введення фосфоліпідів суттєво зменшує вірогідність виникнення аритмій та фібриляції при інфаркті. Таке припущення підтвердилося у повній мірі, коли був вивчений вплив фосфоліпідів на порушення серцевого ритму, яке виникає у відповідь на гостру ішемію, створювану в умовах закритої грудної клітини. Ця модель суттєво приближена до умов кардіологічної клініки, де стрес відіграє величезну роль у пошкодуючій дії гострої ішемії. При стресі без корекції важкі аритмії є необоротними у 55% випадків, 20% тварин гинули. Використання ФХ ліпосом дає виражену антиаритмічну дію, яка проявляється у зменшенні кількості випадків фібриляції. В наших експериментах фібриляція із зупинкою серця після введення ліпосом спостерігалася у однієї тварини з дев'яти з локальною ішемією-реперфузією після перенесеного стресу.

Таким чином, ці факти дають підставу вважати можливим захист серця від ішемії та наступної рециркуляції шляхом введення екзогенних фосфоліпідів.

Аналіз літератури, а також одержані нами дані дозволяють виділити основні моменти у формуванні порочного кола стресорного пошкодження та обґрунтувати генералізований корегуючий ефект ФХ ліпосом при стресі.

Одним з перших проявів порушень нормальної життєдіяльності клітини, викликаних різними етіологічними факторами, є підвищення проникності клітинних мембран.

Зміна іонного гомеостазу клітини сприяє різкому гальмуванню процесів синтезу провідних макроергів за рахунок порушення окислювального фосфорилування, а також порушення структури мітохондрій. Більш того, підвищення концентрації кальція у цитоплазмі клітини веде до активації кальційзалежних ферментів, які різко підсилюють рівень процесів вільнорадикального окислення, що, у свою чергу, зумовлює подальше порушення цілосності клітинних мембран.

Активізація процесів ПОЛ призводить також до накопичення таких речовин, як лейкотрієни та простагландини, що викликають каскад запальних реакцій, в тому числі набряк. Підвищення зводнення тканин

різко знижує ефективність транспорту кисню з крові до клітин та сприяє розвитку тканинної гіпоксії, що замикає порочне коло, бо внаслідок тканинної гіпоксії спостерігається як зростання енергодефіциту, так і активація процесів ПОЛ. Таким чином, ФХ ліпосоми, введені тваринам на тлі стресу, дозволяють ефективно впливати на всі фактори, які є вирішальними у розвитку стресорних пошкоджень в умовах іммобілізаційного стресу.

ВИСНОВКИ

1. Введення ФХ ліпосом на тлі розвитку стресорної реакції сприяло інгібуванню процесів перекисного окислення в усіх досліджуваних тканинах. Кількість первинних та вторинних продуктів ПОЛ після перенесеного стресу залишалась на початковому рівні у серці та печінці, на 15%–40% перевищувала контрольні значення у легенях, мозку та крові у порівнянні з дво-, трьохкратним збільшенням після стресорної дії.

2. Антиоксидантний ефект ФХ ліпосом забезпечується підтриманням високого антиоксидантного статусу як ферментативної, так і неферментативної систем. Введення ФХ ліпосом на тлі стресу сприяло відновленню початкової активності супероксиддисмутази, каталази і глутатіонпероксидази у тканинах мозку, печінки і серця. У крові констатували 70% відновлення глутатіонпероксидазної і 35% супероксиддисмутазної активності при одночасному зниженні рівня токоферола у 2 рази і відновленні стаціонарної концентрації відновленого глутатіону.

3. Фосфатиділхолінові ліпосоми при стресі запобігають 50% і 25% падінню кількості АТФ та двократному-креатинфосфату, що забезпечує збереження сумарного енергетичного заряду гепатоцитів та кардіоміоцитів.

При цьому у 2 рази знижується ступінь метаболічного лактат-ацидозу,

що супроводжує розвиток тканинної гіпоксії.

4. На функціональному рівні корегуючу дію ФХ ліпосом при стресі відображає збільшення ефективності газообміну у легенях, а також антиаритмогенна дія на міокард, що запобігає порушенням електричної стабільності серця.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ

1. Синдром стрессорного легкого и коррекция его фосфолипидами// ДАН СССР.- М.,1990.-Т.310, №3.-С.754-757 (соавт. В.П. Пожаров ,Т.Д. Миняйленко, М.М Середенко, А.В. Стефанов, В.К. Лишко, Ф.З. Меерсон)

2. Антиоксидантная активность фосфолипидов липосом при иммобилизационном стрессе//Стресс, адаптация и дисфункции: Тез.докл.Всесоюзн.симпоз.- Кишинев, 1990.- С.89 (соавт. А.В. Стефанов, О.В. Чупракова .)

3. Липосомы в защите биомембран при стрессах на субклеточном уровне// Стресс, адаптация и дисфункции.- Кишинев, 1990.- С.35 (соавт. В.Н. Ельский, Т.Е. Мареева, С.В. Колесникова)

4. Активность гидролитических энзимов, продуктов ПОЛ и антиоксидантов в митохондриях и лизосомах интактных крыс //Тез.докл. 8 областной научн. конференции морфологов, - Донецк, 1991.- С.18 (соавт. Т.Е. Мареева, Ю.Я. Крюк, Е.И. Снобелева, С.В. Колесникова)

5. Корекція фосфоліпідами ліпосом стресорних пошкоджень серця// Тез. доповідей 4 Укр. біохімічного з'їзду.- Київ, 1992.- С.77 (співавл. О.В. Стефанов, О.Д. Івань)

6. Вплив фосфатиділхолінових ліпосом на рівень макроергічних субстратів у серці та печінці при іммобілізаційному стресі // Тез. доповідей 4 Укр. біохімічного з'їзду.- Київ, 1992.- С.79 (співавт. О.В.Стефанов, О.Д. Івань)

Підп. до друку 23 06 93 Формат 60 * 84 1/4 Папір офс Друк. офс.

Друк. офс. Умовн. друк. арк. 1,16 Обл.-вид. арк. 0,83 Тир. 100

Зам. 3-3903.

Київська книжкова друкарня наукової книги. Київ, Б. Хмельницького, 19.

46572B

Ab 27.770

AB 27.770