

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО
РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

На правах рукописи

ШАРЫПОВА НАТАЛЬЯ ГАВРИИЛОВНА

Механизмы повреждений плазматических мембран лимфоцитов
крови у больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного
синдрома

14.00.16 – патологическая физиология

14.00.45 – наркология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
СЕРЕБРОВ В.Ю.

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор
БАЛАШОВ П.П.

ТОМСК- 2004

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Патогенетические аспекты развития наркоманий.....	14
1.1.1. Синдром физической зависимости при опийной наркомании.....	14
1.1.2. Биологические механизмы формирования наркоманий.....	15
1.1.3. Абстинентный синдром при опийной наркомании.....	19
1.1.4. Нарушение метаболических процессов при наркомании.....	21
1.1.5. Терапия наркоманий опийной группы.....	22
1.1.5.1. Психотропные свойства β – адреноблокаторов.....	27
1.2. Современные представления о липидах, как биоэффекторах.....	29
1.3. Роль сфинголипидов в развитии и течении различных заболеваний.....	31
1.4. Структура и функции мембран лимфоцитов.....	34
1.4.1. Структура и функции биологических мембран при различных видах патологии.....	37
1.5. Система перекисного окисления липидов.....	39
1.5.1. Перекисное окисление липидов. Характеристика процесса.....	39
1.5.2. Регуляция перекисного окисления липидов <i>in vivo</i>	41
1.5.3. Участие перекисного окисления липидов в патологических процессах.....	45
1.5.4. Участие фосфолипаз в повреждении клетки.....	46
1.6. Протеиназно – ингибиторная система в регуляции биологических процессов.....	49
1.6.1. Протеиназы плазмы крови.....	51
1.6.2. Ингибиторы протеолитических ферментов как протекторы клеточных повреждений.....	53
1.6.3. α_1 – Протеиназный ингибитор, α_2 – макроглобулин и их роль в патологии.....	55

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материал.....	59
2.1.1. Характеристика клинического материала.....	59
2.2. Используемые в работе методы.....	62
2.2.1. Выделение лимфоцитов периферической крови.....	62
2.2.2. Выделение плазматических мембран лимфоцитов разделением в двухфазной системе декстран - полиэтиленгликоль.....	62
2.2.3. Разделение липидов мембран лимфоцитов методом тонкослойной хроматографии.....	63
2.2.4. Изучение асимметрии мембранных фосфолипидов с помощью химических реагентов.....	64
2.2.5. Определение активности сфингомиелиназы	65
2.2.6. Определение активности фосфолипазы A ₂	66
2.2.7. Определение активности фосфолипазы D	67
2.2.8. Определение активности процессов перекисного окисления липидов.....	68
2.2.8.1. Определение содержания ТБК – активных продуктов в плазматических мембранах лимфоцитов и сыворотке крови.....	68
2.2.8.2. Определение активности каталазы в плазматических мембранах лимфоцитов и сыворотке крови	68
2.2.8.3. Определение активности супероксиддисмутазы в плазматических мембранах лимфоцитов и сыворотке крови	69
2.2.9. Определение активности протеолитических процессов.....	70
2.2.9.1. Определение активности трипсина в сыворотке крови.....	70
2.2.9.2. Определение содержания плазминогена в плазме крови.....	71
2.2.9.3. Определение содержания растворимых фибринмономерных комплексов в плазме крови.....	72

2.2.9.4. Определение активности α_1 – протеиназного ингибитора в плазме крови.....	72
2.2.9.5. Определение активности α_2 – макроглобулина в плазме крови.....	73
2.2.9.6. Определение активности антитромбина III в плазме крови.....	73
2.2.10. Определение активности фактора Виллебранда в плазме крови.....	74
2.2.11. Определение неорганического фосфата по методу Бодански.....	74
2.2.12. Микробиуретовый метод определения белка.....	75
2.2.13. Статистическая обработка данных.....	75

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изучение липидного состава плазматических мембран лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до проведения лечения, находившихся на стандартном лечении и лечении, проводимом в комплексе с β - адреноблокатором.....	76
3.2 Изучение активности сфингомиелиназы, содержания сфингомиелина и церамидов в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до проведения лечения, находившихся на стандартном лечении и лечении, проводимом в комплексе с β - адреноблокатором.....	92
3.3. Изучение активности фосфолипаз и процессов перекисного окисления липидов плазматических мембран лимфоцитов и сыворотки крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до проведения лечения, находившихся на стандартном лечении и лечении, проводимом в комплексе с β – адреноблокатором.....	98
3.4. Изучение протеиназно-ингибиторной системы плазмы крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до проведения лечения, находившихся на стандартном лечении и лечении, проводимом в комплексе с β – адреноблокатором.....	122

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	142
ВЫВОДЫ.....	152
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	154

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- α_1 – ПИ - α_1 – протеиназный ингибитор
- α_2 – МГ – α_2 – макроглобулин
- β – АБ – β – адреноблокаторы
- АО - антиоксиданты
- АОА - антиокислительная активность
- АТ -III – антитромбин III
- АФК – активные формы кислорода
- КА – катехоламины
- ЛФЛ - лизофосфолипиды
- ПМ – плазматические мембраны
- ПОЛ - перекисное окисление липидов
- РФМК – растворимые фибринмономерные комплексы
- СОД - супероксиддисмутаза
- СФМ – сфингомиелин
- ТБК – ап – ТБК – активные продукты
- ТМА – трансмембранная асимметрия
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- ФАТ- фактор активации тромбоцитов
- ФВ – фактор Виллебранда
- ФИ - фосфатидилинозитол
- ФЛ - фосфолипиды
- ФЛА₂ – фосфолипаза А₂
- ФЛD – фосфолипаза D
- ФНО - фактор некроза опухоли
- ФС - фосфатидилсерин
- ФХ - фосфатидилхолин
- ФЭА – фосфатидилэтаноламин
- ХС - холестерин
- ЭХ - эфиры холестерина

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Распространенность заболевания наркоманией в нашей стране не имеет тенденции к снижению. Показатель заболеваемости наркоманией уже приближается к показателю заболеваемости сердечно-сосудистыми заболеваниями [1, 172]. В настоящее время употребление “чистых” наркотиков встречается чрезвычайно редко. Чаще всего, применяемые наркотические вещества представляют собой кустарно приготовленную смесь из наркотических средств, балластных, психотропных и часто просто токсических веществ. В процессе кустарного приготовления наркотика в смесь дополнительно привносятся вещества (органические растворители, ангидриды, окислители), обладающие собственным токсическим действием. Использование такой смеси ведет к общему отравлению организма. Стало очевидным, что употребление психоактивных веществ ведет не только к развитию личностных и психических аномалий, но и является причиной широкого круга соматических заболеваний [1, 146, 157].

Опийная наркомания в клиническом отношении, прежде всего, проявляется абстинентным синдромом (состояние отмены), развитие которого связано с целым рядом вегетативных, физиологических и биохимических изменений в организме [209]. Это создает благоприятные условия для накопления во всех органах и тканях продуктов клеточного метаболизма и токсинов. По-видимому, в основе развития патологического процесса при абстинентном синдроме лежит дисбаланс клеточного гомеостаза и, как следствие, повреждение и гибель клетки.

В патогенезе опийной наркомании большое значение имеют изменения иммунологического гомеостаза, выражающиеся в большинстве случаев в нарушении клеточного звена иммунитета. Последнее проявляется как угнетением Т-клеточного звена иммунитета, так и повышением уровня циркулирующих иммунных комплексов [82, 155]. Не вызывает сомнения наличие у больных наркоманиями (прежде всего опийной группы) признаков вторичного иммунодефицита, повышающего риск возникновения у них

инфекционных заболеваний и новообразований [51]. Уровень дискоординации иммунологических процессов отражает тяжесть течения заболевания, позволяя дать прогноз в отношении осложнений и отдаленных последствий. Иммунопатогенез опийной наркомании характеризуется выраженными изменениями популяционной и субпопуляционной гетерогенности и функциональной активности иммунокомпетентных клеток [117]. Изучение молекулярных механизмов повреждения клеток, в частности иммунокомпетентных, лежащих в основе развития осложнений опийной наркомании представляет значительный научный и практический интерес.

Сегодня большинство заболеваний рассматривают как состояния, сопряженные с поражением, прежде всего, клеточных мембран, поскольку дестабилизация молекулярной ультраструктуры мембран при патологических процессах приводит к потере их функциональной компетентности, изменению жизнедеятельности клеток в целом и, в конечном счете, к их гибели [52, 143].

Биологическим мембранам принадлежит ключевая роль в обеспечении и регуляции физиологической активности клетки. Хорошо известно, что липиды клеточных мембран являются не только формой депонирования метаболического топлива и основной компонентой клеточных структур, но и системой биологических эффекторов, регуляторов и медиаторов, участвующих практически во всех физиологических процессах клетки [15, 20, 199]. Особый интерес при этом представляет изучение обмена сфинголипидов. Это связано с тем, что сфингомиелин и продукты его ферментативного гидролиза играют определяющую роль в сигнальной трансдукции, регулирующей ведущие клеточные процессы – иммунный ответ, пролиферацию, рост, дифференцировку и апоптоз клеток [4, 69, 169].

Многообразие функций сфингомиелина и его производных, прямо или косвенно связанных с важнейшими клеточными событиями в норме и при патологии, определяет необходимость изучения обмена сфинголипидов в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией.

В регуляции состояния мембран клеток принимают участие процессы перекисного окисления липидов, фосфолипазы, ферменты протеолитической системы. Изучение их активности может быть важным диагностическим критерием общего состояния организма, характеристикой адаптивных процессов при неблагоприятных воздействиях, компенсаторных возможностей организма [38, 39, 121, 167].

Течение и выраженность абстинентного синдрома при наркомании в значительной степени определяет характер лечения и прогноз заболевания. Существует несколько подходов к лечению абстинентного синдрома. Наряду с применением традиционной терапии, также применяют методы экстракорпоральной детоксикации (УФО, плазмоферез) [124, 128, 151, 161]. Однако, анализ приведенных в литературе данных, позволяет сделать вывод о минимальной эффективности лечебных программ, используемых для терапии наркоманий. Такое положение во многом обусловлено недостаточной разработкой проблемы патогенеза наркотической зависимости, и абстинентного синдрома. Необходимость активного поиска новых подходов к лечению больных наркоманиями представляется в этой ситуации чрезвычайно актуальной задачей. Из гипотез, объясняющих формирование физической зависимости от наркотиков, наиболее патогенетически адекватной признается так называемая “катехоламиновая гипотеза” [5]. Известно, что опийная абстиненция протекает на фоне адренергического возбуждения [82]. Избыток катехоламинов в крови может приводить к активации перекисного окисления липидов, активации фосфолипаз, детергентному действию высоких концентраций лизофосфолипидов в липидном бислое мембран, лабильности мембран лизосом и освобождению из них протеолитических ферментов с последующим повреждением клетки. Блокада адренорецепторов, через которые реализуется эффект катехоламинов, может ограничить повреждение клеток, вызванное избытком катехоламинов [133]. Соответственно средствами патогенетической терапии могут являться препараты с β -

адреноблолирующим действием. Исследование влияния β - адреноблокаторов на липидный спектр плазматических мембран лимфоцитов и механизмы, принимающие участие в его регуляции (перекисное окисление липидов, активность фосфолипаз и активизация процессов протеолиза), безусловно, будут способствовать пониманию патогенеза опийной наркомании, возможности прогнозирования исходов и определения тактики лечения данной патологии.

Цель работы:

Изучить механизмы структурных и функциональных нарушений плазматических мембран лимфоцитов крови у больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома при использовании стандартной и комплексной схем лечения абстинентного синдрома.

Задачи исследования:

1. Установить особенности содержания липидов: фосфолипидов, нейтральных липидов в плазматических мембранах лимфоцитов крови у больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома до начала специфической терапии и на фоне стандартной и комплексной схем лечения (в комплексе с β - адреноблокатором).
2. Установить особенности обмена сфинголипидов: активность сфингомиелиназы, содержание сфингомиелина, церамидов в плазматических мембранах лимфоцитов крови у больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома до начала специфической терапии и на фоне стандартной и комплексной схем лечения (в комплексе с β - адреноблокатором).
3. Изучить состояние системы протеолиза в сыворотке и плазме крови (активность протеолитических ферментов и их ингибиторов) у больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома до начала специфической терапии и на фоне стандартной и комплексной схем лечения (в комплексе с β - адреноблокатором).

4. Исследовать активность фосфолипаз, процессы перекисного окисления липидов в плазматических мембранах лимфоцитов и сыворотке крови у больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома до начала специфической терапии, на фоне стандартной и комплексной схем лечения (в комплексе с β - адреноблокатором), а также установить их роль в механизмах нарушения липидного спектра плазматических мембранах лимфоцитов.

Научная новизна:

Впервые у больных опийной наркоманией, находившихся в состоянии абстиненции и получавших традиционное лечение, изучен липидный спектр и обмен сфинголипидов в плазматических мембранах лимфоцитов и их взаимоотношение с основными механизмами фосфолипазного и перекисного повреждения липидов клетки. В результате выполненного исследования были получены новые данные фундаментального характера о метаболических нарушениях в плазматических мембранах лимфоцитов, вызванных употреблением опия-сырца, обработанного уксусным ангидридом. Выявленные изменения характеризуются увеличением содержания холестерина, лизофосфолипидов, фосфатидилхолина и фосфатидилсерина и уменьшением содержания фосфатидилэтаноламина, нарушением трансмембранной асимметрии распределения фосфатидилэтаноламина и отношения холестерина к фосфолипидам, увеличением активности сфингомиелиназы, увеличением содержания сфингомиелина и снижением количества церамидов. Показано, что у больных опийной наркоманией, находившихся в состоянии абстиненции, происходит выраженная активация фосфолипазного и перекисного механизмов повреждения липидов.

Впервые у больных опийной наркоманией проведено изучение состояния протеиназно-ингибиторной системы крови. Выявленные изменения, характеризуются увеличением активности протеолитических ферментов и снижением активности их ингибиторов.

В работе впервые изучена возможность коррекции нарушений липидного спектра и обмена сфинголипидов плазматических мембран лимфоцитов крови с помощью β - адреноблокатора обзидана.

Был выявлен положительный эффект включения в стандартную терапию обзидана на липидный спектр и соотношение компонентов обмена сфинголипидов в плазматических мембранах лимфоцитов, а также механизмы участвующие в их регуляции.

Практическая значимость работы:

Полученные новые знания фундаментального характера, касающиеся изменений липидного состава, обмена сфинголипидов плазматических мембран лимфоцитов и механизмов, участвующих в регуляции состояния мембран у больных опийной наркоманией раскрывают новые аспекты патогенеза опийной наркомании. Результаты исследования могут служить основой для разработки новых способов коррекции метаболических нарушений, возникающих при употреблении наркотических препаратов опийной группы.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Развитие абстинентного синдрома у больных опийной наркоманией сопровождается нарушением в липидном спектре и обмене сфинголипидов плазматических мембран лимфоцитов, в механизме нарушений которых особую роль играют увеличение активности фосфолипаз, процессов перекисного окисления липидов и активизация протеолитических процессов крови.
2. Липидный спектр и обмен сфинголипидов плазматических мембран лимфоцитов у больных опийной наркоманией нормализуется при использовании комплексной схемы лечения абстинентного синдрома путем снижения активности фосфолипаз, угнетения процессов перекисного

окисления липидов и восстановлении баланса протеиназно-ингибиторной системы.

3. Положительных изменений со стороны липидного спектра, обмена сфинголипидов плазматических мембран лимфоцитов и механизмов, принимающих участие в их нарушении, не было выявлено у больных опишной наркоманией при использовании стандартной схемы лечения абстинентного синдрома.

Апробация работы:

Основные положения работы были представлены на заседании Томского Областного общества лаборантов (Томск, 2004), на научном семинаре кафедры биохимии и молекулярной биологии; на кафедре психиатрии, наркологии, психотерапии Сибирского государственного медицинского университета.

Публикации: По теме диссертации опубликовано 9 работ, из них три в центральной печати.

Объем и структура диссертации: Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 178 страницах, иллюстрирована 22 таблицами и 15 рисунками. Библиография включает 251 литературных источника, из которых 212 отечественных и 39 иностранных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Патогенетические аспекты развития наркоманий

1.1.1. Синдром физической зависимости при опиийной наркомании

Под наркоманией подразумевают состояние, определяемое: 1) синдромом измененной реактивности организма к действию данного наркотика (защитные реакции, толерантность, форма потребления, форма опьянения); 2) синдромом психической зависимости (обсессивное влечение, психический комфорт в интоксикации); 3) синдромом физической зависимости (компульсивное влечение, потеря контроля над дозой, абстинентный синдром, физический комфорт в интоксикации) [209]. Эти три синдрома, составляющие большой наркоманический синдром [171], отличают наркомана от здорового человека. И. Н. Пятницкая [1994] выделяет также синдром последствий наркотизации, включающий энергетическое снижение, полисистемное функциональное истощение организма.

Синдром физической зависимости включает: 1) физическое (компульсивное) влечение; 2) способность достигать состояния физического комфорта в интоксикации и 3) абстинентный синдром [209].

Физическое (компульсивное) влечение, один из широко известных признаков наркоманий, выражается в неодолимом стремлении к наркотизации. Влечение достигает высокой интенсивности, вытесняя даже такие витальные влечения, как голод и жажду. Практически одновременно с развитием компульсивного влечения светлого промежутка (вне интоксикации) больной убеждается, что его самочувствие улучшается только при интоксикации, а без наркотика он уже не чувствует себя довольным и здоровым. Приняв индивидуально необходимую дозу, наркоман испытывает и психический, и физический комфорт. Еще более наглядным показателем того, что вне наркотизации удовлетворительное функционирование у наркомана невозможно, является абстинентный синдром.

Абстинентный синдром формируется постепенно и возникает вслед за обрывом наркотизации спустя какой-то срок после последнего приема наркотика [171, 209].

Абстинентный синдром состоит из фаз, появляющихся последовательно и закономерно во времени. Абстинентный синдром представлен симптомами, которые можно разделить на две группы: симптомы психические и симптомы вегетативные, соматоневрологические. Абстинентный синдром является показателем сформировавшейся физической зависимости от наркотика. Это состояние характеризуется необходимостью в постоянном присутствии наркотика для относительно нормального функционирования организма, теперь уже на качественно ином уровне. Если наркотик не поступает, организм пытается самостоятельно, собственными ресурсами воспроизвести условия, соответствующие наркотической интоксикации. Структуры и функции, на которые воздействует наркотик, приводятся в состояние, близкое к тому, которое бывает в наркотической интоксикации. Однако отсутствие обычного условия, интоксикации, ведет к несовершенной компенсации. Отсюда патологическая симптоматика, отличающая абстиненцию от интоксикации, а также избыточная компенсация: гипертензия, тревога, депрессия и т. п.

Таким образом, абстинентный синдром представляет неудачную, дефектную саморегуляцию, попытку организма собственными ресурсами восстановить гомеостаз, соответствующий уровню имеющейся физической зависимости [171, 209].

1.1.2. Биологические механизмы формирования наркоманий в организме человека

Влияние наркотиков на организм человека, его жизнедеятельность и функции проявляется в трех различных аспектах.

Во – первых, наркотики специфически влияют на определенные системы и структуры мозга, вызывая развитие синдрома зависимости. Именно этот синдром является ведущим, стержневым в клинической картине

наркологических заболеваний. Во – вторых, они оказывают токсическое воздействие практически на все внутренние органы и системы организма. Токсическое поражение различных органов не связано напрямую с проявлениями синдрома зависимости. Однако смертность больных наркоманиями (в том числе ранняя) чаще всего обусловлена именно последствиями и осложнениями токсических эффектов наркотических препаратов. Наконец, в – третьих, несомненно, влияние наркологической патологии родителей на потомство. Доказано, что у детей больных наркоманиями существенно повышен риск развития этих заболеваний [82].

Нейрофизиологические механизмы развития зависимости от наркотиков базируются в стволовых и лимбических структурах мозга, тех его областях, где располагается так называемая система подкрепления. Эта система участвует в регуляции эмоционального состояния, настроения, мотивационной сферы, психофизического тонуса, поведения человека в целом, его адаптации к окружающей среде. Результаты многочисленных исследований убедительно доказывают, что именно влияние наркотиков на нейрохимические процессы в мозге являются основой развития синдрома зависимости. При этом массивное воздействие наркотических препаратов приводит к дисфункции почти всех нейрохимических систем мозга. Изучение механизмов действия наркотических препаратов показало, что каждый из них имеет свой фармакологический спектр действия. Но у всех веществ, способных вызвать синдром зависимости, есть общее звено фармакологического действия – это характерное влияние на катехоламиновую нейромедиацию в лимбических структурах мозга, в частности в системах подкрепления [5, 82].

Воздействие наркотиков приводит к интенсивному выбросу нейромедиаторов из группы катехоламинов из депо, а следовательно, к значительно более сильному возбуждению системы подкрепления. Свободные катехоламины подвергаются действию ферментов метаболизма и быстро разрушаются. Повторные приемы наркотиков приводят к истощению

запасов нейромедиаторов, что проявляется недостаточно выраженным возбуждением системы подкрепления при поступлении “нормального” импульса. Психофизически у человека это выражается в снижении настроения, ощущении вялости, слабости, скуки, эмоционального дискомфорта. Прием наркотика на таком фоне вновь вызывает дополнительное высвобождение нейромедиаторов из депо, что временно компенсирует их дефицит в синаптической щели и нормализует деятельность лимбических структур мозга. Этот процесс сопровождается субъективным ощущением улучшения состояния. Однако свободные катехоламины вновь быстро разрушаются, что приводит к дальнейшему уменьшению их содержания, ухудшению психоэмоционального состояния и, соответственно, к стремлению вновь использовать наркотик. Данный порочный круг лежит в основе формирования психической зависимости от наркотических препаратов [82]. При длительном употреблении наркотиков может развиваться дефицит нейромедиаторов, уже угрожающий жизнедеятельности организма. В качестве механизма компенсации этого явления выступают усиленный синтез катехоламинов и подавление активности ферментов их метаболизма, в первую очередь моноаминоксидазы и дофамин – β – гидроксилазы [5, 215], контролирующей превращение дофамина в норадреналин.

Таким образом, стимулируемый очередным приемом наркотиков выброс катехоламинов и их ускоренное, избыточное разрушение сочетаются с компенсаторно-усиленным синтезом этих нейромедиаторов. Формируется ускоренный кругооборот катехоламинов. При прекращении приема наркотика, т. е. при абстиненции, усиленного высвобождения катехоламинов из депо не происходит, но сохраняется их ускоренный синтез (рис. 1). Вследствие изменения активности ферментов в биологических жидкостях и тканях накапливается дофамин. Именно этот процесс обуславливает развитие основных клинических признаков абстинентного синдрома – высокой тревожности, напряженности, возбуждения, подъема артериального давления, ускорения пульса, нарушения сна и пр. Описанные выше

изменения нейрохимических функций мозга формируют физическую зависимость от наркотических препаратов. Уровень дофамина в крови четко коррелирует с клинической тяжестью абстинентного синдрома. В течение ремиссии у больных зафиксированы биохимические корреляты так называемой “сухой абстиненции”, когда на фоне длительной ремиссии временно возвращаются симптомы абстинентного синдрома – бессонница, тревога, раздражительность и пр. В этих случаях отмечается спонтанное повышение уровня дофамина в крови, что соответствует нейрохимическим механизмам абстинентного синдрома [82]. Нужно учитывать тесную функциональную связь всех нейрохимических систем мозга. Изменение деятельности одной из них неизбежно ведет к расстройству других. Именно поэтому для разработки новых эффективных средств лечения наркологических заболеваний следует выделить первоначальное, ведущее звено патологии. Идентичность стержневых механизмов развития зависимости и ее клинических проявлений в динамике различных наркологических заболеваний указывает на принципиальное единство биологических механизмов всех форм химической зависимости. Общее звено в механизме фармакологического действия психоактивных веществ – влияние на катехоламиную, в частности дофаминовую, нейромедиацию в системе подкрепления мозга. Именно оно обуславливает способность вызывать синдром зависимости [5, 82].



Рис. 1. Схема этапов формирования зависимости от психоактивных веществ.

Примечание: КА – катехоламины [82].

1.1.3. Абстинентный синдром при опиной наркомании

В последние годы наблюдается тенденция к употреблению больными наркоманиями самодельных наркотических препаратов, в частности получаемых путем кустарной химической обработки опия-сырца. Использование этих средств, оказывающих, помимо наркотического, также и токсическое действие, отражается на особенностях формирования и течения опиной наркомании [47, 153]. Становление заболевания происходит в более короткие сроки, чем при морфинной наркомании, течение носит более прогрессивный характер, более выражены соматоневрологические

последствия. Наблюдается также своеобразный патоморфоз опиийного абстинентного синдрома. По сравнению с классическим описанием опиийной абстиненции [170] абстинентный синдром, возникающий при употреблении самодельных препаратов опиийной группы, имеет целый ряд характерных особенностей. Проявления абстиненции нарастают лавинообразно и достигают пика интенсивности уже к концу вторых суток после последней инъекции наркотика. Диспепсические расстройства и болевой синдром возникают практически одновременно с ознобом, насморком, потливостью. Обращает на себя внимание значительно большая выраженность в структуре абстиненции психопатологических расстройств. Спектр проявлений психопатологических расстройств во многом зависит от наличия и выраженности преморбидных аномальных свойств личности, дозы вводимого наркотика и длительность его потребления [47]. Соматическое состояние больных в период абстиненции также отличается рядом особенностей: выражена тахикардия при нормальном или пониженном артериальном давлении, часто возникают боли в пояснице. При лавинообразном нарастании и большей выраженности проявлений общая продолжительность острого периода абстинентного синдрома несколько меньше (в среднем около 10 дней), чем описана в литературе [170, 187].

У больных применяющих самодельные наркотические препараты, отмечаются более выраженные изменения вен: быстрее возникают рубцовые изменения, склерозирование и запустевание. Перечисленные особенности клинической картины опиийного абстинентного синдрома, развивающиеся при использовании кустарно приготовленных растворов мака, выраженные наркогенность и токсичность последних диктуют необходимость поиска новых подходов к лечению этой формы наркомании.

Комплексный и дифференцированный подход к терапии опиийного абстинентного синдрома с учетом изменения его клинических проявлений в связи с употреблением больными самодельных наркотических препаратов

позволяет сократить длительность абстинентного синдрома и уменьшить выраженность симптомов острого периода [47].

1.1.4. Нарушение метаболических процессов при наркомании

Существует мнение, что, употребление наркотиков опийной группы сопряжено с минимальным риском развития патологии внутренних органов. В настоящее время использование “чистых” наркотиков встречается редко. Чаще всего они представляют “гремучую смесь” из наркотического средства, балластных, психотропных и часто просто токсических веществ. В процессе приготовления наркотика дополнительно привносятся вещества (органические растворители, ангидриды, окислители), обладающие собственным токсическим действием [163]. Применение такой смеси ведет к общему отравлению, в первую очередь, нарушает деятельность центральной нервной системы [126, 127, 146, 157, 180, 181].

Специфических морфологических изменений, характерных для отравления наркотиками, нет, также как нет и четкой нозологической формы последствий хронической наркотической интоксикации [48, 127]. Однако в последние годы описан целый ряд регистрируемых посмертно изменений внутренних органов и мозга при хронической интоксикации наркотически действующими веществами. При этом специфичность осложнений, определяется не столько видом этих осложнений, сколько их сочетаниями и частотой наблюдения. Например, различные поражения печени возникают почти у всех больных наркоманией, употребляющих кустарные опийные препараты [127]. Распространенным является сочетание дистрофических изменений в печени, почках и миокарде с явлениями продуктивного воспаления, напоминающие токсико-аллергические гранулемы. Острые бактериальные эндокардиты, плевриты в сочетании со спленоомегалией также указывают на иммунотоксический эффект опийных алкалоидов [13, 72, 156 91]. Исследование смертности среди “внутривенных” наркоманов в Москве [6] свидетельствуют о том, что причиной смерти в половине случаев (50,9%) послужило соматическое заболевание, включая инфекционное. Комплекс

тканевых и органных изменений, обнаруживаемых посмертно у наркоманов, употреблявших опиинные алкалоиды, позволяет идентифицировать наиболее часто встречаемую следующую соматическую патологию (таблица 1) [127].

Таблица 1

Клинико-морфологические признаки поражения внутренних органов при систематической опиинной интоксикации

Морфологические диагнозы	%
Белковая дистрофия печени	38,7
Гепатохолангит	20,0
Хронический активный гепатит	18,7
Всего заболеваний, относящихся к патологии печени	56,0
Коронарокардиосклероз, периваскулярный кардиосклероз	26,7
Всего заболеваний, относящихся к патологии ССС	50,6
Бронхопневмония, крупозная и очаговая пневмония	28,0
Всего заболеваний, относящихся к патологии органов дыхания	36,0
Зернистая дистрофия эпителия извитых канальцев	57,3
Всего заболеваний, относящихся к патологии почек	65,1

Основной причиной сопутствующих воспалительных процессов при опиинной наркомании считается подавление системы иммунной защиты организма [91].

Таким образом, можно заключить, что хроническая опиинная интоксикация с большим постоянством сопровождается полиорганной патологией различной степени выраженности: от клинически очевидных случаев до изменений, диагностируемых только на морфологическом уровне [127].

1.1.5. Терапия наркоманий опиинной группы

Лечение зависимости, обусловленной приемом препаратов группы опия, имеет более чем столетнюю историю. Недостаточная эффективность непрерывно разрабатываемых методов лечения опиинных наркоманий

заставляла исследователей вести поиск все новых терапевтических подходов. Известные в настоящее время методы лечения опийных наркоманий группируются как заместительные, патогенетические, симптоматические, немедикаментозные, в том числе физиотерапевтические, психотерапевтические, блокирующие [161].

В настоящее время лечение наркоманий не достигло четкой патогенетической ориентации, во многом симптоматично. Несмотря на большое разнообразие предлагаемых терапевтических подходов, последние по различным причинам все еще не удовлетворяют запросам практической наркологии. Едиными являются общие направления использования фармакологических средств в терапии наркоманий: лечение острой интоксикации и передозировки наркотических веществ; купирование синдрома отмены, вызванного прекращением приема наркотика; терапия соматических последствий интоксикации; лекарственное воздействие на мотивационно-эмоциональные сдвиги, лежащие в основе стремления к повторному приему наркотиков и рецидиву заболевания [128].

На стадии психической зависимости от наркотика доминируют общеукрепляющая и фитотерапия отварами трав с успокаивающим действием (валерианы, мяты, пустырника); витаминотерапия (группы "В"); средства, регулирующие метаболические процессы – гипогликемические дозы инсулина [2], большие дозы аминокислот (глутаминовая, глицин). Обсессивное влечение купируется внутримышечным введением сернокислой магнезии, тераленом, неуптилом [19]. Купирование синдрома отмены представляет собой форму паллиативной помощи и предшествует более специфическим методам лечения наркотической зависимости. Большинство схем отмены наркотика, используемых за рубежом, предусматривают литическое снижение суточной дозы наркотика (на 20% от исходной дозы) с полной отменой за 7-10 дней. При этом наблюдаются легкие абстинентные расстройства. При неудачных попытках лечения отмену наркотика проводят с использованием метадона [95]. В отечественной наркологии применяются

лекарственные средства, не являющиеся препаратами зависимости. Известно, что опиная абстиненция протекает на фоне адренергического возбуждения. Соответственно средствами патогенетической терапии являются препараты с альфа- и бета-адреноблокирующим действием. Для лечения абстинентных расстройств у больных опиной наркоманией рекомендуется использовать пирроксан, обладающий альфа-адреноблокирующим действием [147]. В схемах детоксикации героиновой зависимости используется и бета-блокатор пропранолол [225]. Из неопиатных патогенетических схем наиболее распространена схема терапии опиного абстинентного синдрома с применением клонидина (клофелин). Теоретической основой метода является предпосылка о модулирующей роли эндогенной опиатной системы в отношении адренергических систем. Клонидин, являясь агонистом пресинаптических альфа-адренорецепторов, подавляет выход медиатора из адренергической терминали, имитируя некоторые эффекты опиатов.

Наиболее трудной задачей является разработка методов контроля эмоционально-мотивационных эффектов наркотической интоксикации. В рамках концепции “подкрепления” разрушение порочного круга “наркотизация – синдром отмены с патологическим влечением к наркотику – повторная наркотизация” возможна при устранении психотропного эффекта наркотика, подавлении системы положительного подкрепления наркотической мотивации. Эти принципы, в настоящее время реализуются с помощью следующих способов фармакологического контроля: блокирование эмоционально-позитивного эффекта наркотиков с помощью антагонистов; применение веществ-агонистов, имитирующих эффект наркотика; фармакологическая коррекция нейромедиаторных изменений, вызванных наркотической интоксикацией и предположительно связанных с патологическим влечением [76]. Примером первого типа контроля может служить терапия опиной наркомании антагонистами опиатных рецепторов (налтрексон). Следующее направление связано с применением имитаторов действия наркотиков (метадон). Разновидностью патогенетической терапии

является и лечение нейролептиками (неулептил, дроперидол) благодаря их высоковариабельной способности воздействовать на дофаминергические рецепторы. В условиях, ограничивающих или полностью исключаящих возможность применения “заместительной” и “блокирующей” терапии, остается единственный вариант фармакологической коррекции нейромедиаторных изменений, вызванных наркотической интоксикацией и предположительно связанных с патологическим влечением к наркотику – это адекватное назначение психотропных средств.

Известно, что проявление клинических признаков аффективной патологии вызвано также изменением состояния серотониновой медиаторной системы с увеличением обратного захвата серотонина пресинаптическими окончаниями. Серотонинергической активностью объясняется контроль за импульсивными влечениями, тревогой, агрессивностью [152]. Центральная серотониновая недостаточность, описана как один из механизмов формирования и поддержания аддиктивной мотивации [139]. Эти теоретические предпосылки послужили патогенетическим обоснованием применения препаратов, избирательно блокирующих реаптейк серотонина, в медикаментозной реабилитации больных, зависимых от наркотиков.

Теоретическое обоснование собственно “дезинтоксикационной терапии” в настоящее время недостаточно. Положительные результаты при проведении гемосорбции подтверждают интоксикационную природу некоторых феноменов, развивающихся при опийной абстиненции, хотя о целесообразности и необходимости использования этого метода высказываются противоречивые мнения. С одной стороны, помимо механизмов удаления токсинов, плазмаферез оказывает неспецифическое стимулирующее действие на обменные процессы путем изменения патологического гомеостаза и образования биологически активных веществ из разрушенных форменных элементов крови. С другой стороны, включение плазмафереза в терапевтический процесс у больных опийной наркоманией, особенно в первые дни синдрома отмены, усиливает алгическую

симптоматику, дисфорический аффект, компульсивное влечение к наркотику, что обусловлено, вероятно, активацией симпатoadренальной системы вследствие колебаний объема крови при операции. Контраргументом служит тезис о целесообразности применения дорогостоящего и трудоемкого варианта терапии в состоянии, которое не является жизнеугрожающим [128, 130]. Традиционными средствами дезинтоксикации являются внутривенные инфузии гемодеза, гипертонических, изотонических растворов в сочетании со средствами, влияющими на тканевой процесс: панангином, кокарбоксилазой, рибоксином, малыми дозами инсулина, глюкозой [128].

В последние годы, несмотря на положительные тенденции разработки патогенетически обоснованных методов лечения опийных наркоманий, большинство из предложенных методов оказывают воздействие лишь на отдельные звенья наркотической зависимости: в одних случаях на вегетативные, в других – на алгические, в третьих – на психические расстройства [161]. В связи с этим для купирования абстинентного синдрома применяются сложные и громоздкие схемы лечения.

С 1998 г. отечественные наркологи в своей практической работе ориентируются на “Стандарты (модели протоколов) диагностики и лечения наркологических больных” [162]. Предлагаемые в них схемы лечения опийных наркоманий строго дифференцированы в зависимости от тяжести заболевания, предусматривают сочетанное назначение патогенетических и симптоматических средств на различных этапах лечебного процесса. Практические наблюдения свидетельствуют, что ”стандартная” терапия не всегда оказывается эффективной, особенно если речь идет о состоянии отмены опиатов тяжелой степени. Использование “стандартной” терапии во многих случаях не позволяет быстро и эффективно купировать синдром патологического влечения к опиатам. Это приводит к прерыванию по инициативе больного курса лечения и возобновлению наркотизации.

Изложенное делает крайне актуальным обновление терапевтической эффективности и внедрение в наркологическую практику методов, воздействующих на различные звенья патогенеза наркотической зависимости. Они должны в короткие сроки купировать состояние отмены опиатов и эффективно влиять на проявления синдрома патологического влечения к наркотикам [161].

1.1.5.1. Психотропные свойства β -адреноблокаторов

Проблема поиска новых высокоактивных психотропных препаратов является важнейшей задачей современной психофармакологии. Значительные перспективы в этом направлении имеет изыскание эффективных средств среди препаратов, применяющихся в смежных областях медицины [101].

Последние годы отмечены широким применением психофармакологических средств для лечения зависимости от опиатов [161]. В то же время, очевидно, что даже применение психофармакологических препаратов новых поколений не способно решить такие проблемы, как результативное купирование тяжелого состояния отмены опиатов, быстрое и полное устранение патологического влечения к наркотику. Внедрение в практику немедикаментозных методов лечения опиных наркоманий невозможно без современного дорогостоящего оборудования и специальной подготовки медицинского персонала. Указанные обстоятельства препятствуют широкому их использованию в отечественных наркологических клиниках. Аналогичная ситуация складывается и в отношении получающих все большую популярность в России методов "сверхбыстрой детоксикации". Длительное применение дорогостоящих антагонистов опиатов (налтрексон) должно сочетаться с мероприятиями, направленными на подавление патологического влечения к наркотику, без чего назначение этих препаратов не дает ожидаемого результата [161].

Так как одним из последствий хронической наркотической интоксикации является поражение сердечно-сосудистой системы [127] то при

лечении больных с наркотической зависимостью желательно использовать препараты, обладающие как нейротропной зависимостью (способны влиять на генерацию и проведение нервных импульсов, на освобождение и механизмы функциональной инактивации), так и обладающие кардиопротективным действием и способные уменьшать возбудимость проводящей системы сердца. К таким препаратам можно отнести β – адреноблокаторы (β – АБ). Уже вскоре после начала широкого применения β – АБ для лечения сердечно-сосудистых заболеваний клиницисты установили, что вещества этой группы способны также влиять на психические процессы. Наиболее характерным свойством β – АБ признается влияние веществ на эмоциональную сферу [7]. Следует отметить, что подобным действием обладают липофильные β – АБ, способные проникать через гематоэнцефалический барьер. Согласно литературным данным β – АБ снижают чувство тревоги и страха у здоровых испытуемых, при длительном приеме подавляют агрессивность больных страдающих шизофренией, потенцируют анксиолитическую активность бензодиазепиновых транквилизаторов. Ряд авторов отмечают у β – АБ антипсихотический эффект. Они отчетливо снижают депрессивную симптоматику, потенцируют действие антидепрессантов. Психотропные эффекты β – АБ связывают:

- с изменением функции церебральных β – адренорецепторов
- с влиянием на уровень цАМФ
- с влиянием на норадренергические входы нейронов коры с последующим их растормаживанием
- с гиперчувствительностью различных рецепторных аппаратов (в том числе адренорецепторов) при аффективных расстройствах
- с антисеротониновыми свойствами β – АБ

Существенным моментом служит адекватно подобранная доза того или иного препарата. С увеличением дозы адреноблокатора знак психофармакологической реакции может меняться на прямо противоположный [7].

1.2. Современные представления о липидах, как биоэффекторах

Понятие “липиды” охватывает широкий спектр малополярных природных веществ, различающихся между собой химической структурой. К ним относятся свободные жирные кислоты, нейтральные глицериды, воски, фосфолипиды, сфинголипиды, в том числе гликосфинголипиды, оксипирины, стеринны и т.д. Длительное время липиды рассматривали как форму депонирования метаболического топлива. Позднее было установлено, что они являются основными структурными компонентами клеточных мембран [15, 20, 203, 206].

В последнее время было установлено, что липиды являются важнейшими биологическими эффекторами, регуляторами и медиаторами, участвующими практически во всех важнейших физиологических процессах (иммунный ответ, передача нейрональной информации, регуляция сосудистого и мышечного тонуса, гемостаз, воспаление и т.д.), включая биохимические реакции, протекающие в клетках животных и человека. В качестве вторичных мессенджеров они передают внутрь клетки различные внешние сигналы, а также сами являются межклеточными медиаторами [41, 65, 66, 68, 224, 238, 246, 247].

К настоящему времени накоплено огромное количество данных о биоэффекторной функции липидов как в организме в целом, так и в клетке в частности [4, 26, 41, 65, 66, 70, 173, 223, 240, 243, 250]. Широко известна биоэффекторная роль фосфолипидов. Так, имеются многочисленные данные об участии в процессах сигнализации в качестве вторичных мессенджеров представителей фосфоинозитидного цикла - диацилглицеринов, инозитфосфата, инозит-1,4,5-трисфосфата, фосфатидной кислоты - которые стимулируют некоторые формы протеинкиназы C, мобилизуют Ca^{2+} из внутриклеточных депо и т.д. [9, 195, 243].

В последнее время появилось большое количество данных о регуляторной функции лизофосфатидилхолина. Эндогенные лизофосфатиды могут играть важную роль в формировании ответной реакции клеток на стимулирующие

или угнетающие факторы и регулировать клеточный метаболизм. Известно, что ЛФЛ контролируют активность некоторых мембранно-связанных ферментов [53]. Было обнаружено, что при низких концентрациях лизофосфатидилхолин стимулирует активность протеинкиназы C, усиливает клеточную пролиферацию, стимулирует дифференцировку лимфоидных клеток и т.д. [53, 108, 165, 217].

Сфинголипиды и их метаболиты (сфингенин, сфингенин-1-фосфат, церамиды) в качестве вторичных мессенджеров участвуют в процессах роста, дифференцировки и апоптоза клеток [4, 70, 132, 175, 200, 201, 211, 248].

Гликофинголипиды участвуют в процессах роста, дифференцировки и распознавания клеток, в межклеточных взаимодействиях, а также межмембранной передаче сигналов [26, 164, 165, 228], являются антигенами и активными иммуномодуляторами [129, 222, 226, 227].

Клетка может одновременно подвергаться воздействию нескольких липидных эффекторов. Липидные регуляторы и мессенджеры могут оказывать противоположное влияние на процессы в клетке (церамиды стимулируют апоптоз, а диацилглицерины ингибируют его; диацилглицерины стимулируют протеинкиназу C, а сфингенин ее ингибирует). В то же время различные липидные биорегуляторы могут обуславливать один и тот же метаболический эффект (например, мобилизация Ca^{++} наблюдается при действии инозит-1,4,5-трисфосфата, сфингенина, сфингенин-1-фосфата, арахидоновой кислоты, лизофосфатидилхолина, 2-арахидоноилглицерина; стимуляция апоптоза сфингенином или церамидами и т.д.) [190].

Таким образом, липиды являются важными биоэффекторами, без которых не может протекать жизнедеятельность клетки и организма в целом. В настоящее время можно утверждать, что липидам присущи три основные функции: во-первых, липиды - это важнейшие структурные компоненты клеточных мембран; во-вторых, липиды - это биоэффекторы, регулирующие внутриклеточные биохимические реакции и межклеточные взаимодействия,

а также различные физиологические процессы, происходящие в организме. И, наконец, третья функция, которая в течение долгого периода времени считалась единственной, - это форма запаса метаболического топлива.

1.3. Роль обмена сфинголипидов в развитии и течении различных заболеваний

Среди многочисленных процессов, происходящих с липидами, особый интерес представляет сфингомиелиновый цикл, так как его компоненты принимают активное участие в регуляции жизненной программы клетки, оказывая влияние на процессы пролиферации, дифференцировки, апоптоза [69]. Основными компонентами сфингомиелинового цикла являются промежуточные метаболиты сфингомиелина и ферменты, контролирующие соответствующие превращения. К промежуточным метаболитам относятся: сфингенин, сфинганин, сфингенин-1-фосфат, церамиды.

Установлено, что сфинголипиды влияют на структурные свойства биологических мембран и липопротеинов [190, 193]; являются мембранными «якорями» некоторых белков [249]; участвуют в процессах клеточного узнавания, рецепции гормонов, токсинов, факторов роста, лейкинов, в регуляции и дифференцировке клеток, являются иммуномодуляторами и вторичными мессенджерами [4, 70, 86].

Сфинголипиды в основном локализируются в плазматических мембранах и в мембранах органелл, функционально связанных с плазматическими мембранами (аппарат Гольджи, эндосомы и лизосомы). Понятие «сфинголипиды» объединяет сотни соединений липидной природы, различающихся между собой химическим строением и биологическими функциями, но объединенных общей основой – сфингоидным основанием. Церамиды состоят из двух фрагментов: сфингоидного основания (главным образом сфингозина, т.е. сфингенина) и жирнокислотного остатка, соединенных амидной связью [118].

В последнее десятилетие было установлено, что свободный сфингоид – сфингенин - ингибирует протеинкиназу C *in vitro* и влияет на клеточный ответ при активации протеинкиназы C в тромбоцитах, нейтрофилах и миелоидных лейкоэмических клетках HL-60 [86, 87].

Церамиды являются вторичными мессенджерами и участвуют в процессах регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток [67, 69]. Установлено, что биологический эффект зависит от структуры сфингоидного основания и жирных кислот, входящих в молекулу церамида [65, 176].

Церамиды являются промежуточными соединениями в биосинтезе и метаболизме сфингомиелина – структурного липидного компонента клеточных мембран.

Известно, что сфингомиелин образуется, в основном, путем переноса фосфохолиновой группы с фосфатидилхолина на церамид с помощью церамидфосфохолинтрансферазы [10]. При этом отмечается корреляция образования сфингомиелинов из церамидов в зависимости от структуры жирных кислот и сфингоидных оснований, входящих в молекулу церамида. Однако существует и альтернативный путь биосинтеза сфингомиелина – через ацилирование сфингозилфосфохолина ацил-CoA. По второму пути биосинтеза в молекулу сфингомиелина могут включаться кислоты, отсутствующие в пуле церамида.

К настоящему времени установлено, что при патологических состояниях организма, в частности при злокачественном росте, изменяется состав и метаболизм сфинголипидов, что приводит к нарушению структуры и функций клеток. Установлено, что при клеточной малигнизации, как правило, относительное содержание сфингомиелина увеличивается, при этом наблюдается не только изменение в количестве сфингомиелина, но и его локализация. В клетках злокачественных опухолей происходит “выравнивание” содержания сфингомиелина в различных мембранах. Так как в молекуле сфингомиелина присутствуют в основном остатки насыщенных

жирных кислот, то увеличение его содержания способствует повышению микровязкости липидного бислоя мембраны, его ригидности. Между тем, известно, что жидкость липидной фазы биологических мембран является существенным фактором регуляции внутриклеточных процессов. Повышение микровязкости липидного бислоя мембраны может привести к снижению активности мембрансвязанных ферментов (5'-нуклеотидазы, Na,K-АТФазы). Поскольку многочисленные данные свидетельствуют о том, что в опухолях активность многих ферментов значительно снижена, не исключено, что одной из причин этих нарушений является повышение ригидности липидного бислоя мембран вследствие увеличения содержания СФМ [67].

Известно, что снижение активности такого фермента как 5'-нуклеотидазы приводит к нарушению функций транспорта аденозина в клетки, дефицит которого является причиной функциональной недостаточности лимфоцитов. С другой стороны известно, что содержание церамидов в малигнизированных клетках резко снижено. В целом, исходя из того, что церамиды обладают антипролиферативной активностью и стимулируют апоптоз, было высказано предположение, что церамиды являются супрессорами роста опухолей [67].

Таким образом, нарушения в обмене сфинголипидов способствуют изменению жидкости мембраны, ферментативной активности мембраносвязанных ферментов, антигенного статуса клетки, межклеточных взаимодействий, адгезивных свойств и передачи сигналов между мембранами. Возникновение таких нарушений в мембранах лимфоцитов может способствовать появлению лимфоцитов с измененным поверхностным фенотипом, что приводит к нарушению иммунологического гомеостаза, выражающегося в нарушении клеточного звена иммунитета. Это может являться одним из основных факторов, обуславливающих нарушение функциональной активности лимфоцитов.

1.4. Структура и функции мембран лимфоцитов

В последнее время изучение структуры и функции биологических мембран является одним из наиболее важных и быстро развивающихся направлений в биологии. Показано, что липиды не просто образуют матрицу для функционирования мембранных белков, но сами являются активными участниками этих процессов. Изменение липидного состава мембран приводит к изменению способности лимфоидных клеток подвергаться активации под влиянием митогенов или других внешних факторов.

Липидный состав плазматических мембран лимфоцитов изучен достаточно подробно; он представлен в таблице 2. [202].

Таблица 2

Липидный состав плазматических мембран лимфоцитов (%)

Нейтральные липиды	47	В т.ч. холестерин 21-27
ФЛ	47	ФХ 44 – 48 ФЭА 20 – 21 ФС + ФИ 14.5 – 16 СФМ 17.5 – 13.5
Гликосфинголипиды	2.1	В т.ч. ганглиозиды 0.3

Липиды выполняют роль матрикса для мембранных белков, создавая необходимые условия для их функционирования, в частности, необходимую жидкость. При прочих равных условиях жидкость мембраны можно изменить, изменив отношение ХС/ФЛ, которое в покоящихся лимфоцитах равно 1,01. Для того, чтобы клетка функционировала нормально, отношение ХС/ФЛ должно находиться в определенных, весьма узких пределах [44]. Основная функция ХС – создание определенной степени жесткости мембраны, необходимой для ее нормального функционирования. ЖК различной степени насыщенности входят в состав мембранных ФЛ, жирнокислотный состав которых изменяется в зависимости от содержания их

в пище. Степень насыщенности ЖК и содержание ХС влияют на подвижность мембраны [103].

Включение ненасыщенных ЖК в клеточные мембраны приводит к увеличению цитолитической способности клеток, а насыщенных – к ее уменьшению. Кинетика этого влияния оказалась параллельной включению ЖК в состав сложных липидов мембран. В норме ФХ плазматических мембран лимфоцитов обогащен пальмитиновой, СФМ и ФЭА – миристиновой, а гликофинголипид – олеиновой кислотами. Изменение распределения ЖК среди липидов может привести к изменению микровязкости мембраны, к последующим конформационным перестройкам рецепторных молекул и, как следствие, к уменьшению способности клетки к активации митогенами [98, 202]. Большое значение имеют липидные производные простагландины, лейкотриены, ФАТ, которые относятся к биологически активным веществам. Они образуются при расщеплении ФХ, ФЭА, ФИ и не только участвуют в межклеточных взаимодействиях, но и регулируют функциональное состояние клеток [80, 110, 177].

Известно, что активация иммунокомпетентных клеток сопровождается гидролизом мембранного фосфолипида фосфатидилинозид – 4, 5 – бифосфата под влиянием фосфолипазы С. При этом образуется диацилглицерол, который стимулирует протеинкиназу С, и инозитолтрифосфат, который вызывает выброс кальция из внутриклеточных депо. Подобный механизм описан для Т – и В – лимфоцитов, клеток макрофагального ряда, полиморфноядерных лейкоцитов, естественных киллеров [84].

В тучных клетках, нейтрофилах, макрофагах процесс активации связан с изменением во фракции ФХ, содержание которого увеличивается во внешнем слое мембраны, вследствие чего уменьшается вязкость этого слоя и возрастает поступление кальция в клетки. ФХ образуется из ФЭА путем поэтапного метилирования. В свою очередь, образование ФЭА связано с трансформацией ФС, который находится во внутреннем слое

фосфолипидного бислоя мембраны. Поступление кальция и процесс метилирования сопровождается активацией фосфолипазы A_2 и освобождением арахидоновой кислоты из ФХ [202]. Арахидоновая кислота активирует НАДФН - оксидазную систему с образованием супероксиданиона, синглетного кислорода. В результате окислительного метаболизма по липоксигеназному и циклооксигеназному путям образования свободных радикалов гидроксила образуются активные производные – лейкотриены и простагландины, обладающие иммуномодулирующими свойствами [114].

Таким образом, процесс активации иммунокомпетентных клеток- это сложное явление, связанное со структурными изменениями ФЛ плазматических мембран. С процессами активации тесно связаны пролиферативные реакции иммунокомпетентных клеток. Избыток насыщенных жирных кислот угнетает пролиферацию лимфоцитов вследствие уменьшения доли ненасыщенных жирных кислот, участвующих в процессе передачи активационного сигнала, а также, вследствие увеличения вязкости липидного бислоя, уменьшения подвижности белков в бислое и вероятности взаимодействия рецепторных субъединиц с регуляторными субъединицами. Устойчивость клеток-мишеней к действию цитолитических Т- лимфоцитов связана с содержанием в мембране ФЛ (ФХ и СФМ), изменяющих поверхностный заряд мембраны. Снижение поверхностного заряда в результате увеличения содержания ФХ и СФМ повышает чувствительность клеток – мишеней к лизису, так как облегчает их контакт с киллерами [20].

Таким образом, липиды осуществляют связь между рецепторными белками, ферментными и другими системами лимфоцита, участвуют в реализации активационного сигнала, который формируется при контакте лектина с рецепторами.

1.4.1. Структура и функции биологических мембран при различных видах патологии

Среди универсальных механизмов жизнеобеспечения клетки важнейшими являются биоэнергетические процессы. Липиды, входящие в состав мембран, несут на себе основную функциональную нагрузку при активации и кооперации клеток, регуляции иммунного ответа и т. д.

У детей, больных сахарным диабетом обнаружены структурные нарушения мембран эритроцитов. У больных с первым типом сахарного диабета происходит снижение содержания СФМ и ФЭА [89, 184] и повышение ФС, ФИ. Исследование липидных компонентов мембран эритроцитов больных вторым типом сахарного диабета показало, что наблюдается возрастание содержания ХС и снижение ФХ, ФЭА и СФМ, ФИ. Обращает на себя внимание тот факт, что с развитием диабетических микроангиопатий повышается количество ЭХ, участвующих в процессах детоксикации и выведения из метаболического русла избытка НЭЖК. Повышение уровня ЭХ существенно увеличивает проницаемость мембран эритроцитов для одновалентных ионов [71] и тем самым может снижать осмотическую стойкость эритроцитов. Независимо от типа сахарного диабета при наличии сосудистых поражений резко уменьшается уровень СФМ. Исходя из того, что СФМ участвует в процессах межклеточного взаимодействия и рецепции, можно предположить, что уменьшение количества СФМ отражает степень снижения чувствительности эритроцитов к инсулину [194].

Известно, что при значительном изменении липидного состава мембраны становятся ригидными. Повышение микровязкости мембран в условиях патологии чаще всего обусловлено отношениями ХС/ФЛ, ФЭА/ФХ. Выяснено, что при втором типе диабета изменение микровязкости в основном осуществляется за счет возрастания содержания ХС, повышающего «жесткость» мембраны вследствие упорядочения и снижения

свободного объема. При первом типе диабета повышение микровязкости в большей степени связано с уменьшением отношения ФЭА/ФХ [194].

Изменения липидного состава эритроцитов «пассивно» следует за изменениями липидного состава сыворотки крови у детей с сахарным диабетом. Напротив, изменения липидного состава мембран лимфоцитов при сахарном диабете носят «активный» характер и, видимо, вызваны смещением метаболических превращений липидов на новый патологический уровень. При этом меняются показатели липидного состава, имеющие значение в осуществлении функциональной активности лимфоцитов: увеличивается коэффициент ХС/ФЛ, (ограничение подвижности), уменьшается процентное содержание ТГ, НЭЖК (энергетическое обеспечение, источник ПГ, ЛТ).

Таким образом, потерю функциональной активности иммунокомпетентных клеток, описанную рядом авторов при сахарном диабете, можно связать с «активным» дисбалансом в липидном обмене лимфоцитов. Выявленные изменения липидного состава мембран лимфоцитов являются одним из основных факторов, снижающих функциональную активность лимфоцитов, обуславливающих формирование иммунодефицита и как следствие присоединение инфекционных заболеваний [184].

Нарушения липидного обмена являются одним из основных факторов повышенного риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Так, у мужчин, перенесших инфаркт миокарда в возрасте от 18 до 40 лет, в эритроцитах крови было обнаружено увеличение содержания фракций ФХ, СФМ и уменьшение ФЭА [145]. Одним из ключевых моментов в патогенезе атеросклероза и его осложнений является увеличение содержания ХС в плазматических мембранах форменных элементов крови, приводящее к изменению физического состояния липидной фазы [116, 207]. Накопление в липидном бислое ХС, ведет к нарушению внутриклеточного ионного гомеостаза в результате угнетения активности ферментов транспорта ионов. Увеличение содержания ХС в мембранах форменных элементов крови

направлена на стабилизацию липидного бислоя и ограничение их проницаемости для кальция [203]. Выход кальция из внутреннего фосфолипидного слоя плазматической мембраны в цитоплазму, как известно, является пусковым сигналом для каскада реакций, завершающихся пролиферацией. Накопление ХС и связанный с этим рост вязкости липидной фазы приводит к уменьшению интенсивности процессов митогенстимулируемого перераспределения кальция. Все это ведет к угнетению функций этих клеток [43, 61, 107].

Повышение микровязкости мембран клеток может быть связано как с накоплением ХС, так и со сдвигом качественного состава ФЛ в сторону СФМ, а так же с замещением в структуре ФЛ полиненасыщенных ЖК насыщенными, которые обладают меньшей, чем первые, подвижностью, следовательно, способностью увеличивать «жесткость» мембраны [118].

У больных алкоголизмом выявлены существенные нарушения ФЛ состава биомембран, в частности повышенное образование различных форм ЛФЛ, возникающее на фоне уменьшения содержания ФХ и ФЭА и отсутствие изменений суммарного содержания ФЛ [54, 93].

Таким образом, изучение биохимических нарушений в иммунокомпетентных клетках, а именно, нарушений в липидном составе мембран лимфоцитов, является перспективным направлением в изучении патогенеза наркотической зависимости.

Один из механизмов, участвующих в регуляции состояния биологических мембран, является процесс перекисного окисления липидов.

1.5. Система перекисного окисления липидов

1.5.1. Перекисное окисление липидов. Характеристика процесса

Одним из основных факторов, регулирующих липидный обмен, является перекисное окисление. Первые представления Б.Н. Тарусова и Н. М. Эмануэля о возможности возникновения и развития реакций свободно-радикального перекисного окисления в липидной фазе биологических мембран [38] позволили заключить, что эти процессы не только играют

важную роль в нормальной физиологии клетки, но и выступают как ключевые звенья патогенеза распространенных болезней: авитаминозы E, K, ишемические и реоксигенационные повреждения, диабет, злокачественный рост, стрессовые расстройства, токсическое действие гипербарической оксигенации и озона и ряда других [11, 12, 56, 115]. Вывод об участии процессов ПОЛ в возникновении и развитии патологических состояний был сделан, на основе способности ингибиторов свободнорадикального окисления различной природы предупреждать или ограничивать повреждения, характерные для разных патологий [75].

Радикальные реакции ПОЛ протекают во всех клетках живых организмов, четко отражают функциональное состояние субклеточных и клеточных мембранных структур, имеющих существенное значение для жизнеобеспечения целостного организма. Развитию того или иного патологического процесса предшествует повреждение именно мембран клетки, однако и другие структуры, в том числе хроматин ядра, подвергаются влиянию активных продуктов ПОЛ из мембран [11, 12].

ПОЛ представляет собой многоэтапный процесс окислительной деградации их полиненасыщенных жирнокислотных остатков. В ходе процесса ацильные цепи подвергаются гомолитическим разрывам по С-С и С-Н связям с образованием высокоактивных радикальных интермедиатов, промежуточных молекулярных продуктов, низкомолекулярных конечных соединений и продуктов полимеризации с неопределенной химической структурой, играющих важную роль в процессах модификации биологических мембран и их свойств [92, 99].

Процесс ПОЛ делят на три фазы: зарождение цепей, развитие цепных реакций и обрыв цепей. Лимитирующей стадией процесса в целом является стадия его инициации [38]. В тканях организма представлены различные механизмы активации ПОЛ. Индукция может происходить при спонтанном самоокислении ряда химических соединений (например, метгемоглобина, флавинов, катехоламинов, тиолов) [60]. Инициаторами цепного окисления

липидов могут быть энзиматические системы. Так, генерация активных форм кислорода (АФК), обладающих высокой реакционной способностью, связана с окислительно-восстановительными ферментативными реакциями, катализируемыми флавиновыми дегидрогеназами, глутатионредуктазой, дигидратат дегидрогеназой, а также металлофлавопротеидами, ксантиноксидазой в процессе окисления пуринов в фагоцитирующих клетках, при функционировании миелопероксидазы нейтрофилов, альдегидоксидазы, митохондриальных (цитохром с-оксидаз) и микросомальных (НАДФ и НАД монооксигеназы) цепей переноса электронов и других биохимических реакциях [55, 136].

В тканях имеются специфические ферментные системы: цикло- и липоксигеназы, осуществляющие ферментативное перекисное окисление ПНЖК [113]. Известно большое количество процессов, протекание которых невозможно без участия свободных радикалов или инициируемых ими продуктов окисления. Они имеют важное значение для обновления липидов, необходимы для поддержания стабильности структурного клеточного гомеостаза и состава внутренней среды организма, для уничтожения собственных отживающих клеток, выведения ксенобиотиков, осуществления процесса фагоцитоза, предупреждения злокачественной трансформации клеток, модулируют энергетические процессы, пролиферацию и дифференцировку клеток, синтез простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов, транспорт ионов, активность терминальной дыхательной цепи в митохондриях; с другой стороны, АФК оказывают повреждающее действие [97].

1.5.2. Регуляция процессов перекисного окисления липидов *in vivo*

Регуляция реакций ПОЛ в мембранных структурах достигается за счет согласованной системы ферментативного и неферментативного контроля за содержанием АФК, свободных радикалов, молекулярных продуктов ПОЛ, компартиментализацией инициаторов и субстратов ПОЛ.

Регулирование процессов ПОЛ осуществляется трехступенчатой системой: ферментами антиоксидантной защиты, антиокислительной активностью липидов и за счет изменения способности липидов к окислению [17, 49]. Существуют как цитозольные (СОД, каталаза, и др.), так и мембранно-связанные системы (липиद्रастворимые антиоксиданты, структурный эффект) обеспечивающие определенный уровень перекисного окисления в клетке [26,185]. Различные ступени каскада антиоксидантных ферментов, согласно представлениям о механизме генерации АКМ и липидных перекисей, имеют выраженную специализацию, характеризуются высокой специфичностью действия, клеточной и органной локализацией [136, 137, 138]. Реакцию дисмутации супероксидного анион-радикала осуществляет высокоспецифичный фермент - супероксиддисмутаза (СОД: КФ 1.15.1.11) - металлопротеид с субъединичной структурной организацией. Существует несколько изоферментных форм СОД. Cu, Zn - СОД локализована преимущественно в цитозоле и межмембранном пространстве митохондрий клеток эукариотов; Mn- СОД содержится в митохондриях эукариотов, а также у бактерий; для микроорганизмов характерна Fe- СОД, обнаружена также экстрацеллюлярная высокомолекулярная форма СОД [62, 63]. Снижение активности СОД являются причиной патологических процессов, вследствие увеличения АФК и в результате усиления цитотоксического действия перекиси водорода, образующейся при дисмутации супероксидного анион - радикала [31, 123, 221]. Последовательность действия двух координированных систем СОД и каталазы высокоэффективно ингибирует образование гидроксильного радикала, наиболее реакционноспособного из АФК [137, 138].

Клетки млекопитающих достаточно устойчивы к воздействию перекиси водорода благодаря наличию глутатионпероксидазы и каталазы, первая из которых эффективно работает при малых концентрациях перекиси, вторая - при высоких [135].

Каталаза (КФ: 1.11.16) - фермент локализован преимущественно в пероксисомах клеток, катализирует разложение перекиси водорода [75].

Антиокислительный барьер на этапах, следующих за стадией инициации, создается за счет ингибиторов свободнорадикальных реакций [38]. Специфических ингибиторов для гидроксильных и липидных радикалов нет ввиду высокой неспецифичности их реакций с разными органическими молекулами. Природными ингибиторами являются различные токоферолы, стероидные гормоны, аскорбиновая кислота, убихиноны, витамин К, пуриновые основания и другие [46]. Их АОА в целом складывается из способности реагировать со свободными радикалами, разрушать гидроперекиси без образования радикалов, активности радикала, образующегося из молекулы ингибитора [27]. Наиболее мощным и изученным природным антиоксидантом является токоферол [25].

Ключевой этап индукции ПОЛ - гомолитический распад гидроперекисей с образованием новых реакционноспособных радикалов предупреждается глутатионпероксидазной ферментативной системой, которая может использовать в качестве субстратов гидроперекиси фосфолипидов, свободные жирные кислоты с превращением их в нетоксичные оксипроизводные интермедиаты β - окисления жирных кислот [233].

Другая возможность антиокислительной защиты на этапе индукции ПОЛ состоит в удалении из гидрофобной фазы ионов металлов при участии эндогенных хелаторов, основными из которых являются мочевиная кислота, некоторые пептиды, лактоферрин, церулоплазмин, трансферрин, гаптоглобин, альбумин, ферритин и другие. Эти белки находятся в плазме, и могут, как антиоксиданты неферментативной природы поддерживать стационарную концентрацию продуктов ПОЛ [97, 131, 194].

Важным неспецифическим фактором регуляции ПОЛ, действующим практически на все стадии процесса, является так называемый структурный эффект, под которым понимается комплекс свойств мембранного бислоя,

ограничивающего доступность молекул кислорода и его активных форм, а также радикальных интермедиатов и катализаторов ПОЛ к полиеновым ацилам фосфолипидов [26, 27, 38].

Существует гипотеза, согласно которой процессы ПОЛ в клетке поддерживаются на стационарном уровне с помощью системы, организованной по принципу отрицательной обратной связи по замкнутому кругу и обрывающей цепи окисления [26, 112]. При этом изменение количества природных антиоксидантов в липидах, их антиокислительная активность, состав и окисляемость связаны таким образом, что возможно осуществление эффективной регуляции процессов ПОЛ. Воздействие, при котором изменяются параметры любого звена этой цепи, должны приводить в действие всю сложную систему регуляции, в результате чего скорость окисления липидов возвращается на исходный стационарный уровень. Такого рода взаимосвязь между изменениями АОА и состава липидов может рассматриваться с одной стороны, как физико-химическая регуляция, обуславливающая протекание окислительных реакций в липидах на постоянном уровне, с другой, как одна из систем обновления состава липидов мембран [17].

Антиокислительные системы организма в своей совокупности обладают значительной буферной емкостью, сохраняющей активность ПОЛ на стационарном уровне. В условиях напряжения механизмов регуляции существенно повышается риск их срыва и развития патологического процесса. Окислительные и антиоксидантные звенья являются, таким образом, важными составляющими гомеостаза организма [11, 12, 58].

В условиях значительных изменений активности образования радикалов, либо недостаточной эффективности работы антиоксидантных механизмов, резервная мощность антиокислительных систем оказывается недостаточной для полной компенсации несбалансированного свободнорадикального окисления, что приводит к развитию окислительного стресса, которым обозначают состояние напряжения антиоксидантных систем, нарушение

баланса между радикальными окислительными процессами и функционированием системы антиоксидантной защиты [133, 135]. Нарушение окислительных процессов при различных патологических состояниях является основным метаболическим синдромом, формирующим развитие многочисленных морфофункциональных изменений, которые могут проявляться на клеточном, тканевом, организменном уровне [135]. Возникновение окислительного стресса это важный патогенетический фактор развития воспалительных процессов, бронхо-легочных, сердечно-сосудистых и генетических заболеваний [136, 138].

Изменение реакций перекисного окисления при многих заболеваниях позволяет сделать вывод о том, что в их основе лежат мембрано-деструктивные процессы. Поэтому изучение ПОЛ и совершенствование методов контроля окислительных процессов *in vivo* представляет не только теоретический, но и большой практический интерес.

1.5.3. Участие перекисного окисления липидов в патологических процессах

Процесс ПОЛ протекает как в нормально функционирующей клетке, так и при патологических состояниях. Известно множество патологических состояний, для которых характерно нарушение равновесия процессов свободнорадикального окисления липидов. В последнее время в патогенезе диабетических ангиопатий, наряду с нарушениями обмена липидов большое значение придают продуктам ПОЛ. Имеются сообщения о том, что продукты ПОЛ тормозят синтез простаглицина и способствуют развитию гиперкоагуляции, что ускоряет развитие сосудистых осложнений [125]. Большое значение придается интенсификации процессов ПОЛ и синдрому антиоксидантной недостаточности в нарушении функциональной целостности тканей респираторного тракта и повышении сосудисто-тканевой проницаемости при многих видах патологии дыхательных путей. На фоне снижении всех компонентов системы антиоксидантов отмечается значительное повышение уровня продуктов ПОЛ при затяжном и

рецидивирующем течении бронхолегочных заболеваний, у лиц с бронхоэктатической болезнью, при пневмосклерозе, туберкулезе, сахарном диабете [111, 122].

Избыточная интесификация ПОЛ является одним из ключевых механизмов развития структурно-функциональных нарушений в клеточных мембранах тканей центральной нервной системы. Изучение ПОЛ позволило сформулировать перекисную концепцию атерогенеза. Выявлена важная роль свободнорадикального окисления в развитии многих видов патологии новорожденных и детей раннего возраста. Известно также, что канцерогенезу сопутствует накопление продуктов ПОЛ [38].

Принимая во внимание фундаментальное биологическое значение динамического равновесия систем ПОЛ – АОС для жизни клеток, нельзя не учитывать этого механизма при изучении патогенеза зависимости от наркотических средств.

1.5.4. Участие фосфолипаз в повреждении клетки

В регуляции функционального состояния мембран особая роль принадлежит системам, осуществляющим ферментативные и неферментативные превращения мембранных фосфолипидов. Наиболее важными из них являются фосфолипазы, катализирующие гидролиз и трансэтерификацию мембранных липидов. Обнаружено участие фосфолипаз в ряде физиологических и патологических процессов. Литературные данные о взаимосвязи ПОЛ и ферментативного липолиза противоречивы. Так было показано, что фосфолипаза A_2 , оказывает стимулирующий эффект на скорость ПОЛ, тогда как другие авторы продемонстрировали ингибирование ПОЛ в результате гидролиза мембран фосфолипазой A_2 [22, 27, 245].

Фосфолипазы – особый класс белков, специфическая функция которых состоит в расщеплении фосфолипидов клеточных мембран и липопротеидов [198]. Продукты фосфолипазной реакции обладают токсическим действием на организм человека и животных, поскольку большинство из них является гемолитическими ядами.

Фосфолипаза A₂ (лецитиназа A₂, фосфатид-2-ацилгидролаза; К.Ф. 3.1.1.4.), ранее называемая просто лецитиназой A, катализирует гидролитическое отщепление жирной кислоты в β-положении молекулы фосфолипида. Образующийся при этом продукт носит название лизофосфолипид [25, 57].

Лизофосфолипиды обладают сильным гемолитическим действием. В плазме крови человека содержится 50-120 мг/л лизофосфолипидов, связанных с альбуминами и липопротеидами, что нивелирует его токсическое действие. В последнее время появилось множество данных о регуляторной функции лизофосфатидилхолина (лизолецитина), который ранее рассматривался только как эндогенный детергент. Было обнаружено, что при низких концентрациях (1-10 мкМ) лизофосфатидилхолин стимулирует активность протеинкиназы C, усиливает клеточную пролиферацию, стимулирует дифференцировку лимфоидных клеток и т.д. [26, 59, 244].

Фосфолипаза A₂ - наиболее изученный фермент из группы фосфолипаз. Он выделен в чистом виде из яда змей, пчел и из ткани поджелудочной железы животных. В мембранах митохондрий, выделенных из животных тканей, присутствуют фосфолипазы A₂, которые устойчивы к нагреванию, не содержат SH- групп и являются кальций-зависимыми ферментами. По своим свойствам эти ферменты напоминают таковые из ядов змей и поджелудочной железы. Митохондриальные фосфолипазы играют важную роль в функционировании мембран, по всей вероятности выполняя транспортную функцию [22].

К настоящему времени установлено, что внутриклеточные фосфолипазы A₂ участвуют в таких важных биохимических процессах, как образование лизофосфатидилхолина алкильного типа - исходного соединения в биосинтезе липидного фактора активации тромбоцитов (ФАТ), высвобождение свободной арахидоновой кислоты - предшественника эйкозаноидов. ФАТ является первичным медиатором воспалительных и аллергических реакций [118, 160, 229]. Эйкозаноиды так же играют важную

роль в развитии внутриклеточного ответа при воспалительных процессах [110, 237, 242]. Учитывая то обстоятельство, что объектом атаки фосфолипазы A_2 являются мембраны, можно ожидать наличие корреляции между степенью повреждения мембранных структур и тяжестью течения многих заболеваний. Также известно, что фосфолипаза A_2 повышает выход из клеток биологически активных веществ – ацетилхолина, адреналина, гистамина, что может иметь значение при патологии [198]. В то же время повышение активности фосфолипазы A_2 приводит к удалению токсичных перекисленных жирнокислотных остатков фосфолипидов из тканей [99, 198].

Полагают, что вещества, ингибирующие фосфолипазу A_2 , могут обладать полезными фармакологическими свойствами. Среди ингибиторов фосфолипазы A_2 обнаружены вещества, значительно различающиеся по своей химической структуре и физиологическому действию: катионные амфифилы, замещенные бутирофеноны, *n*-алканола, производные стрептомицина и стрептримициламина, структурные аналоги фосфолипидов. За исключением структурных аналогов фосфолипидов указанные выше вещества являются неконкурентными ингибиторами фосфолипазы A_2 , механизм действия которых заключается в изменении свойств липидного бислоя и, как следствие этого, ингибирование связывания фермента с поверхностью мембраны [22, 244].

Фосфолипаза D (лецитиназа D; фосфатидилхолин-фосфатидилгидролаза; К.Ф. 3.1.4.4.) впервые обнаружена в растениях. Фосфолипаза D гидролизует эфирную связь между фосфатной группой и гидрофильным спиртом в фосфоглицеридах и соответствующую связь в сфингомиелинах.

Фермент практически не обладает устойчивостью к высокой температуре и не выдерживает даже непродолжительного нагревания до 70°

В клетке фосфолипаза D действуя на ФЛ, приводит к высвобождению фосфатидной кислоты, которая, действуя на диацилглицерол, активирует

сфингомиелиназу и происходит стимуляция сфингомиелинового цикла [10, 29].

Переокисный и фосфолипазный механизмы повреждения липидов тесно взаимосвязаны. Окисленные фосфолипиды легче подвергаются гидролизу фосфолипазами, а фосфолипазы, в свою очередь, нарушая целостность липидного бислоя мембран, делают липиды более доступными для свободно-радикального окисления. Тот и другой механизмы тесно взаимосвязаны с циклом сфингомиелина. ПОЛ действует на цепи жирных кислот, которые входят в состав сфингомиелина и церамида, а продукты действия фосфолипаз являются активаторами цикла сфингомиелина.

Таким образом, исследование активности фосфолипаз – ферментов, участвующих в обмене фосфолипидных компонентов клеточных мембран может иметь диагностическое значение и использоваться в качестве критерия эффективности проводимой терапии.

Кроме перекисного и фосфолипазного механизмов, в регуляции состояния мембран могут принимать участие и протеолитические ферменты.

1.6. Протеиназно – ингибиторная система в регуляции биологических процессов

К числу фундаментальных достижений молекулярной биологии последних лет относится осознание протеолиза как особой формы биологической регуляции. Ограниченный протеолиз служит пусковым механизмом многих биологических процессов и обеспечивает быстрый физиологический ответ организма на меняющиеся условия или поступающий извне сигнал [121]. Понимание регуляторной роли протеолитических ферментов имеет первостепенное значение для расшифровки молекулярных механизмов таких биологических явлений, как деление и трансформация клеток, дифференцировка и морфогенез, нейробиологические процессы и т. д. Этим определяется большой интерес к изучению протеолитических ферментов в медицине [121].

Протеолитические ферменты участвуют в регуляции биологических процессов на разных уровнях (рис. 2).

Они контролируют концентрацию белковых и пептидных биорегуляторов на молекулярном уровне, включены в реализацию многих клеточных функций (биогенез структур, фагоцитоз, деление и т. д.) и тем самым играют важную роль в физиологии клетки. Первостепенная роль принадлежит протеолитическим ферментам в осуществлении ряда физиологических процессов, реализуемых определенными системами белков или отдельными тканями. В таких процессах, как свертывание крови, активация системы комплемента и т. д., протеолиз служит не только для запуска, но и для реализации всего процесса. Образуя и инактивируя различные продукты – медиаторы, протеиназы участвуют в гормональной, нейро- и иммунорегуляции и тем самым вовлечены в координацию функционирования различных клеточных систем и интеграцию организма как целого [32, 121, 166].



Рис. 2. Протеолитические ферменты в системе биологической регуляции [121].

1.6.1. Протеиназы плазмы крови

Существует пять протеолитических систем плазмы крови: свертывающая, противосвертывающая, кининовая и ангиотензин-рениновая, а также система комплемента. Все эти системы действуют по каскадному принципу с чередованием неактивных, активирующих и ингибирующих компонентов. Такой принцип организации позволяет в случае необходимости

существенно ускорить физиологические процессы организма, а также тонко их регулировать на каждом этапе. Активация систем протеолиза способствует образованию биологически активных пептидов с противоположным характером действия, обеспечивая нормальное функционирование сложной системы гомеостаза. Протеолитические ферменты плазмы крови являются, как правило, сериновыми протеиназами. К ним относятся плазмин, тромбин, калликреин, ренин, которые регулируют активацию фибринолитической, свертывающей, кининовой и ангиотензиновой систем [166].

Согласованное действие протеолитических систем обеспечивается общими активаторами. Общим активатором протеолитических систем крови может быть трипсин. Трипсин, представляет собой сериновую протеиназу. Действие трипсина в организме более разностороннее. Кроме активации проферментов поджелудочной железы (химотрипсин, проэластаза, профосфорилаза) трипсин превращает проинсулин в инсулин, проренин в ренин, предшественника адренокортикотропного гормона в активный гормон. Установлено, что трипсин участвует в образовании кининов, активирует плазминоген, увеличивает концентрацию фибриногена.

Известны эффекты трипсина на биологические мембраны: повышение проницаемости, изменение электропроводности и поверхностного заряда, трипсин активирует аденилатциклазу, высвобождение альдостерона, увеличивает транспорт глюкозы по типу инсулина. Имеются данные о способности трипсина воздействовать на ферменты обмена нуклеиновых кислот и белка. Установлено, что трипсин способен индуцировать клеточную пролиферацию (синтез ДНК, фосфорилирование гистонов, метилирование ДНК). Принимает участие в ответе Т и В лимфоцитов на митогенный стимул. В норме трипсин в плазме крови существует в неактивном состоянии из-за образования комплекса с ингибиторами. Увеличение активности трипсина в плазме, как правило, связано с повреждением поджелудочной железы и может быть патогенетическим фактором развития таких патологических

состояний как язвенная болезнь, панкреатит, инфаркт миокарда, лучевая болезнь, нарушение микроциркуляции и развитие шоковых реакций. Повышение активности трипсина может являться рекомендацией для назначения ингибиторов протеолиза в терапии подобных состояний [34, 196].

1.6.2. Ингибиторы протеолитических ферментов как протекторы клеточных повреждений

Присутствие в тканях большого количества протеолитических ферментов, требует наличия ингибиторов протеиназ, которые контролируют действие ферментов, защищают ткань от аутолиза. За последние годы опубликовано значительное количество работ о влиянии эндогенных и экзогенных ингибиторов протеолитических ферментов на структуру, биохимизм и функцию клетки при различных неблагоприятных воздействиях на организм. Изменение метаболизма, структуры и функции клеток во многом предопределяется активацией внеклеточных и внутриклеточных процессов ограниченного протеолиза [167].

Каскадная, лавинообразная активация этих ферментов сдерживается и регулируется клеточной системой ингибиторов протеиназ, которые осуществляют специфическое блокирование активности протеолитических ферментов. Высокомолекулярные ингибиторы находятся в основном в плазме крови. К ним относятся: α_1 – антитрипсин – поливалентный ингибитор, который тормозит биологическое и энзиматическое действие многих протеолитических ферментов; α_1 – антихимотрипсин, который ингибирует преимущественно химотриптическую активность; α_2 – макроглобулин – основной ингибитор калликреина. Кроме того, имеются ингибиторы с узким спектром действия: C_1 – инактиватор, блокирующий активацию системы комплемента; антитромбин III, предупреждающий активацию тромбина в системе гемокоагуляции, и ряд других [83, 167].

Взаимодействие ингибиторов плазмы крови и протеолитических ферментов плазмы и тканей представлено на рисунке 3.

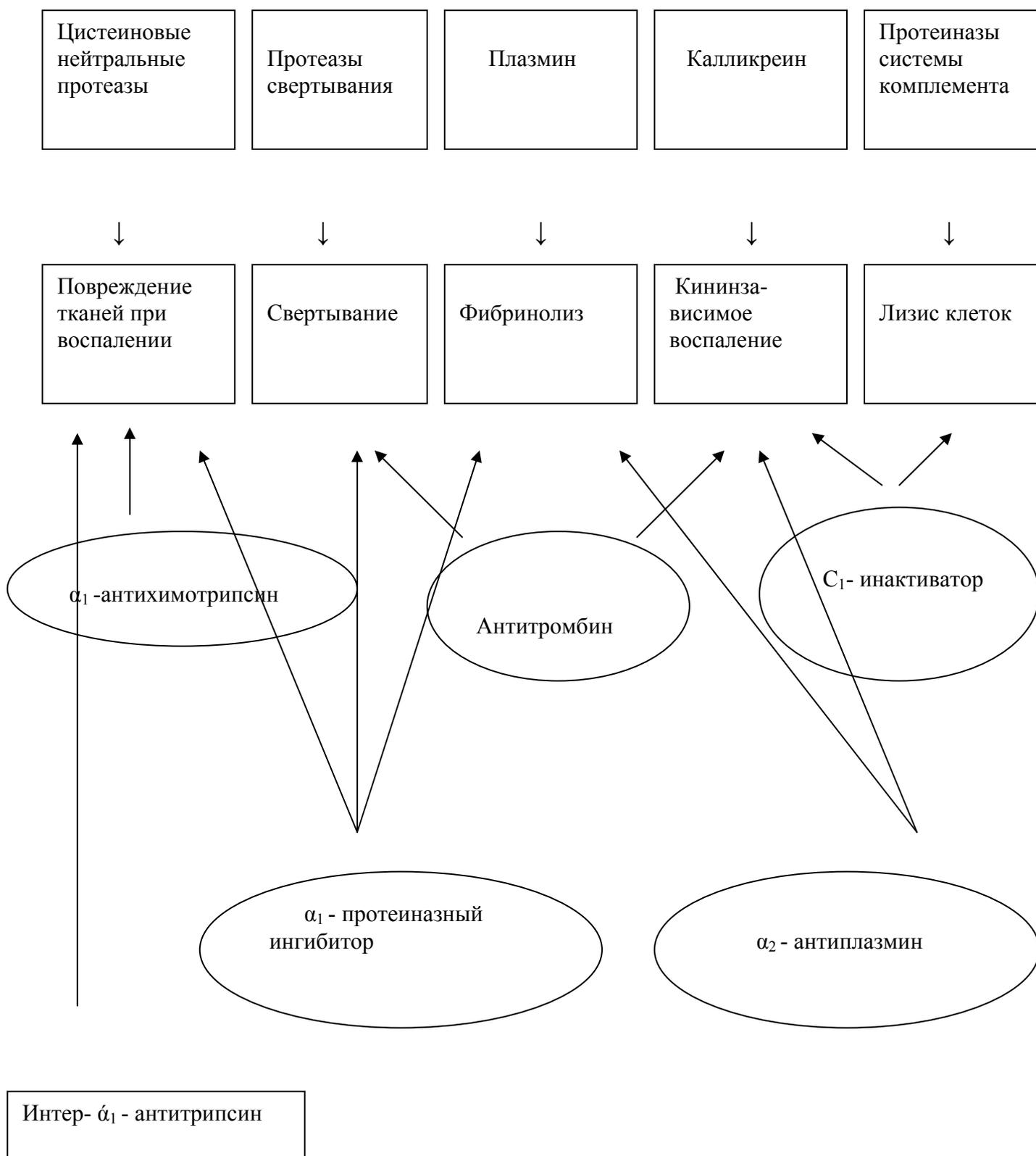


Рис. 3. Взаимодействие ингибиторов плазмы крови с протеолитическими ферментами плазмы крови и тканей.

В соответствии с этой схемой в воспалительных реакциях при повреждениях участвуют цистеиновые протеиназы, нейтральные протеиназы лейкоцитов, действие которых контролирует α_1 – антихимотрипсин, интер - α_1 – ингибитор трипсина, α_1 – протеиназный ингибитор.

Протеиназы каскада свертывающей, кининовой, фибринолитической систем взаимодействуют с антитромбином III, α_2 – антиплазмином, C_1 – инактиватором, α_1 – протеинасным ингибитором [83].

1.6.3 α_1 – Протеиназный ингибитор, α_2 – макроглобулин и их роль в патологии

Из 7 наиболее изученных в настоящее время ингибиторов протеолиза плазмы крови особый интерес представляет α_1 – протеиназный ингибитор (α_1 – ПИ), локализованный в α_1 – глобулиновой фракции. α_1 – ПИ обладает широким спектром действия. Кроме трипсина, он тормозит активность эластазы, коллагеназы, тромбина, плазмина, калликреина, акрозина, фактора X и XI свертывания крови, а также микробные сериновые протеиназы [24]. При патологических состояниях в плазме (сыворотке) крови наблюдается как понижение, так и повышение уровня α_1 – ИП [33]. Пониженный уровень ингибитора, не связанный с генетическими нарушениями, выявляется у больных с неонатальной дыхательной недостаточностью, острой желтой атрофией печени, при заболеваниях почек связанных с повышенной протеинурией [90].

Увеличение концентрации α_1 – ПИ при воспалении происходит вследствие усиленного поступления этого белка в кровь, из которой он достигает поврежденных тканей, где быстро взаимодействует с освобожденными из клеток протеолитическими ферментами. Полагают, что недостаток этого белкового ингибитора предрасполагает к повреждению соединительной ткани лизосомальными протеазами, высвобождающимися в процессе фагоцитоза. Особую роль при этом играет эластаза нейтрофилов.

Все это усугубляется действием некоторых ксенобиотиков, табачного дыма. Протеолитические ферменты, кроме расщепления тканевых структур, могут также усиливать образование окисляющих веществ, вследствие чего α_1 – ПИ значительно инактивируется, т. е. ингибиторное звено исключается из механизма контроля за действием образующихся протеиназ. По имеющимся данным, протеазы, продуцируемые микроорганизмами, разрушают α_1 – ПИ. Поэтому эти микроорганизмы, инактивируя ингибитор, дают возможность эндогенным сериновым протеиназам вызывать деструкцию тканей [24]. В последние годы проявляется большой интерес к изучению диагностической ценности определения α_1 – ПИ крови при ненаследственной патологии [33, 141]. Уровень α_1 – ПИ возрастает при остром и хроническом панкреатите [33]. Острый вирусный гепатит сопровождается увеличением концентрации α_1 – ПИ в сыворотке крови, в то время как при хроническом течении заболевания выявляются низкие его значения. Антипротеолитическая активность сыворотки резко повышается после приема алкоголя, а также у больных хроническим алкоголизмом [35].

Значительную регуляторную роль выполняет α_2 – макроглобулин (α_2 – МГ) [64]. Он синтезируется гепатоцитами, лимфоцитами, полиморфноядерными лейкоцитами, макрофагами, фибробластами [34, 79]. α_2 – МГ функционирует не только в кровеносном русле, но и в лимфе, плевральной, асцитной, синовиальной жидкостях. α_2 – МГ является универсальным ингибитором, подавляет активность протеаз всех четырех классов – сериновых, тиоловых, кислых и металлопротеиназ. Образую комплекс с протеиназами, α_2 – МГ не ингибирует их полностью, а только снижает их активность: тормозит протеиназную и сохраняет при этом эстеразную [34].

α_2 – МГ играет важную роль в деятельности иммунной системы: стимулирует развитие лимфоцитов и гранулоцитов, ингибирует образование кининов, ингибирует митогенный эффект ФГА, КонА, ингибирует высвобождение катионных протеаз при фагоцитозе и т. д. Модификация α_2 –

МГ иммунологических реакций, вероятно, связана с ингибированием протеиназозависимых стадий иммунологических феноменов, а также может быть основана на взаимодействии ингибиторов с факторами, контролирующими функционирование иммунокомпетентных клеток. Известно, что α_2 – МГ способен связывать фактор роста тромбоцитов и макрофагов, фактор роста фибробластов, ИЛ₁. Обладая широкой специфичностью к протеолитическим ферментам, α_2 – МГ предотвращает избыточный протеолиз, принимает участие в защитных реакциях организма, является важным диагностическим показателем ряда патологических состояний организма. Активность α_2 – МГ сыворотки крови возрастает при воспалительных процессах, при сахарном диабете, нарушении функции почек [64].

В связи с выше изложенным, определение активности ингибиторов протеолитических ферментов может быть важным диагностическим критерием состояния протеолиза в организме, а также расширяет возможности использования данных ингибиторов в диагностике ряда патологических состояний [35].

Таким образом, использование наркотических средств, полученных путем кустарной химической обработки опия-сырца, оказывающих наркотическое и токсическое действие отражается на особенностях абстинентного синдрома. В основе развития патологических процессов при наркомании лежит дисбаланс клеточного гомеостаза, сопровождающийся повреждением клеточных мембран в результате непосредственного влияния, как самого наркотического вещества, так и химических веществ, используемых для его приготовления. Биологическим мембранам принадлежит ключевая роль в обеспечении и регуляции физиологической активности клеток. Известно, что липиды клеточных мембран являются не только формой депонирования метаболического топлива и основным структурным компонентом клеточных мембран, но служат молекулярной основой, определяющей их структурные и функциональные свойства и

системой биологических эффекторов, регуляторов и медиаторов, участвующих практически во всех физиологических процессах клетки. Наркотические вещества, являясь высоколипотропными соединениями, взаимодействуют с мембранами, поэтому несомненный интерес представляет исследование липидного спектра мембран, поддержание которых на физиологическом уровне является неременным условием нормального функционирования клетки; компонентов обмена сфинголипидов – играющих определяющую роль в сигнальной трансдукции, регулирующей ведущие клеточные процессы – иммунный ответ, дифференцировку и апоптоз клеток; основных механизмов повреждения мембран клетки – действие фосфолипаз, протеолитических ферментов, процессов перекисного окисления липидов. Именно поэтому в настоящей работе проведено сравнительное исследование этих процессов у больных опишной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома находившихся на разных видах лечения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Материал

2.1.1. Характеристика клинического материала

В основу работы положены результаты обследования 100 человек, которые были разделены по четырем группам. Схема распределения больных по группам представлена на рис. 4. Первую группу составили 75 больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома (шифр по МКБ – 10 F 11.30). В первой группе взятие крови осуществляли в первые сутки после поступления в стационар до начала лечения (Группа 1). Вторую группу составили 41 больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома на фоне стандартной схемы лечения (Группа 2). В третью группу были включены 34 больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома на фоне комплексной терапии (стандартная схема лечения в комплексе с применением препарата группы β - адреноблокаторов (обзидан) в дозе 20 мг/сутки) (Группа 3). Во второй и третьей группе взятие крови осуществляли на 4-5 сутки от последней инъекции наркотика. Четвертую группу составили 25 практически здоровых доноров (Группа контроля).

Взятие крови осуществляли утром натощак из локтевой вены. Ни у одного из пациентов не был выставлен диагноз ВИЧ. Также в исследование не включались пациенты, инфицированные вирусом гепатита.

Пациенты поступили в стационар областного наркологического диспансера в связи с выраженными проявлениями синдрома отмены, которые развились в результате систематического внутривенного введения опия-сырца обработанного уксусным ангидридом. Длительность потребления наркотиков составляла от 3 до 7 лет с суточной дозой от 2 до 4 граммов. Пациенты за пределами клинических проявлений синдрома отмены исключались из исследования. Также не включались в исследование пациенты, которые употребляли наркотические препараты эпизодически. Скрининг пациентов проходил с февраля 2002 по июль 2003года.

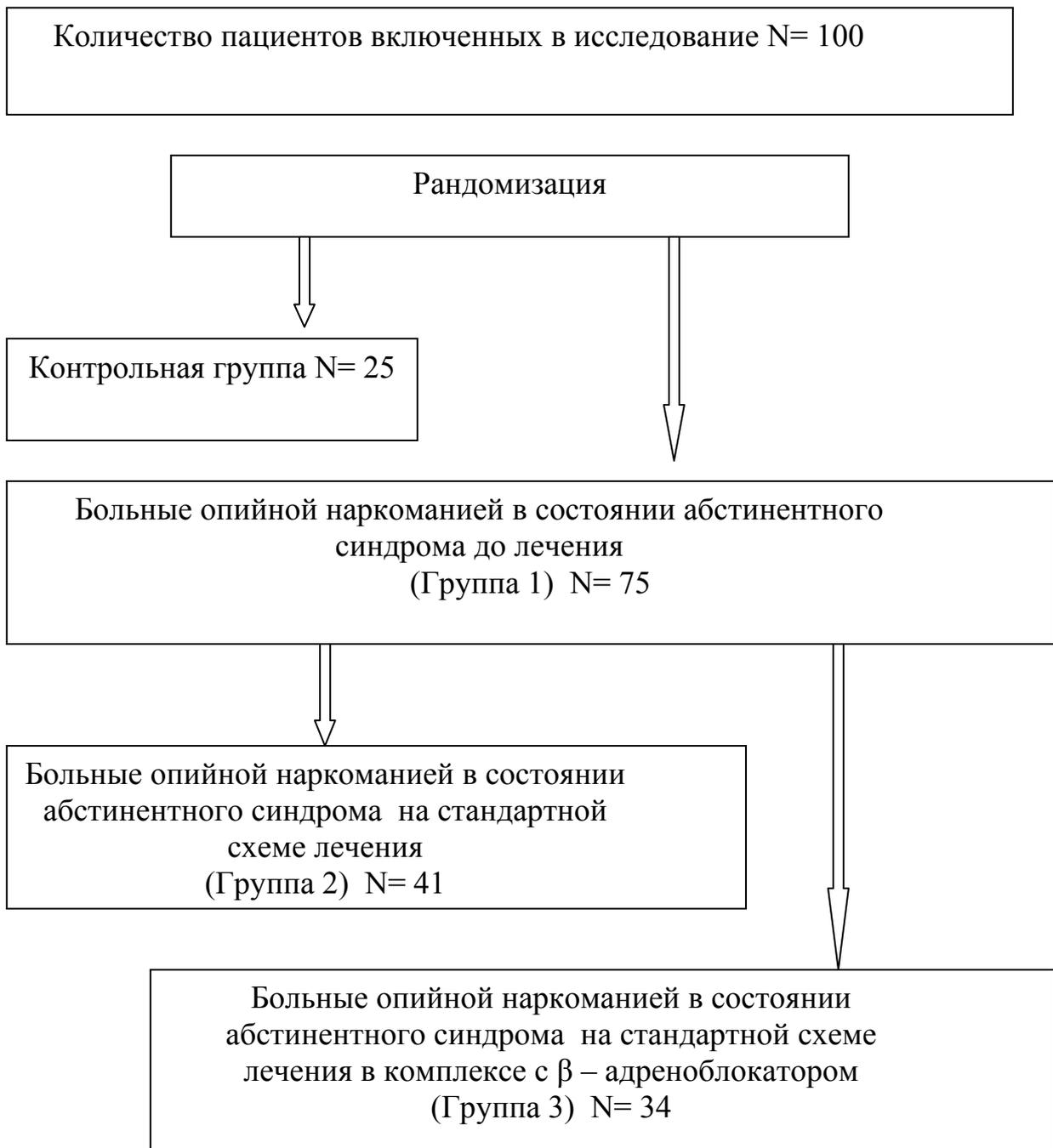


Рис. 4. Схема распределения больных по группам.

Возрастно-половая характеристика обследованных больных, а также здоровых доноров представлена в табл.3.

Возрастно-половая характеристика больных опийной наркоманией и здоровых доноров

Показатель	Группа контроля	Группа 1	Группа 2	Группа 3
Распределение по полу (муж/жен)	16/9	55/20	29/12	26/8
Средний возраст	25,9 ± 3,4	24,9 ± 3,8	24,9 ± 3,8	23,6 ± 3,9

Исследовали лимфоциты, сыворотку и плазму. Сыворотку получали путем центрифугирования крови при 1500 об/мин в течение 15 минут. Для получения плазмы кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 1:9 с последующим центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 минут.

Во всех случаях опийной абстиненции отмечалась выраженная клиническая картина, сопровождавшаяся целым рядом биохимических расстройств. По данным историй болезни при поступлении нарушение биохимических и клинических показателей характеризовались: гипербилирубинемией, снижением уровня гемоглобина, лейкоцитозом, протеинурией. С клинической точки зрения при поступлении в стационар у обследованных больных выявлялся болевой синдром, а также анорексия, рвота, диарея, обильная потливость, повышение артериального давления, повышение температуры тела, неврологические симптомы в виде расстройств периферической нервной деятельности, вегетативная дисфункция (тремор). В соматическом статусе явлений дистрофии выявлено не было. Так как в группе 1 забор крови осуществляли в первые сутки абстинентного синдрома до начала лечения, то это не исключает наличия в крови наркотического средства. Стандартная медикаментозная терапия

опийной абстиненции проводилась в соответствии со стандартами лечения наркоманий и включала в себя использование клофелина, нейролептиков, седативных средств. Пациенты лечение проходили стационарно под контролем медицинского персонала. Все назначения вносились лечащим врачом. Препарат для комплексной схемы лечения обзидан разрешен для применения в медицинской практике.

2.2. Используемые в работе методы

2.2.1. Выделение лимфоцитов периферической крови [119]

Метод основан на разделении клеток крови по плотности.

Кровь в количестве 9,0 мл забирали из локтевой вены в пластиковую пробирку, содержащую 1,0 мл 3,8% раствора цитрата натрия, и тщательно перемешивали.

На дно сухой пробирки наливали 1,5-2 мл градиента плотности "HISTOPAQUE" - 1077 (производства "SIGMA DIAGNOSTICS") и аккуратно, наклонив пробирку под углом 45⁰, наслаивали на градиент кровь. Пробирки центрифугировали при 1500 об/ мин в течение 40 минут. После центрифугирования снимали кольцо лимфоцитов находящееся между плазмой и градиентом. Клетки трижды отмывали физиологическим раствором.

2.2.2 Выделение плазматических мембран лимфоцитов разделением в двухфазной системе декстран-полиэтиленгликоль [199]

Метод основан на разделении клеточных компарментов в двухфазной системе декстран (500 000)- полиэтиленгликоль 6000.

1. Приготовление двухфазной разделительной системы: 100 мл. 30% декстрана (500 000), 70 мл 24% полиэтиленгликоля 6000, 100 мл. дистиллированной воды и 50 мл. 50 мМ фосфатного буфера, рН 7,8 сливали и тщательно перемешивали 6 кратным переворачиванием колбы. Смесь оставляли на 24 часа при 0-4⁰С. Затем отбирали верхнюю фазу (фаза 1) и нижнюю (фаза 2) и использовали для выделения мембран.
2. Лимфоциты разрушали трехкратным замораживанием-размораживанием и

обработкой 0,2% тритоном X-100.

3. В сухую пробирку вносили 1 мл. фазы 2 и наслаивали на нее фазу 1. Затем аккуратно наслаивали 1 мл. разрушенных лимфоцитов и центрифугировали при 3000 об/ мин в течение 30 мин. Кольцо плазматических мембран снимали после центрифугирования с раздела фаз. Все процедуры выполняли на холоду.

2.2.3. Разделение липидов мембран лимфоцитов методом тонкослойной хроматографии [71]

Получение липидного экстракта. Метод основан на способности полярных растворителей (метанол) разрушать липид-белковые связи, что позволяет осуществить последующую экстракцию липидов неполярным растворителем – хлороформом.

0.5 мл взвеси ПМ лимфоцитов центрифугировали 15 мин. при 4000 об/мин. К осадку добавляли 1.6 мл метанола и оставляли на 10 мин. После этого добавляли 3,3 мл хлороформа и оставляли на 15 мин. Затем смесь центрифугировали 60 мин. при 3000 об./мин. После центрифугирования собирали 4 мл надосадочной жидкости. В нее добавляли 1/5 объема 50 мМ раствора CaCl_2 . Через 15 мин. эту смесь центрифугировали при 1500 об./мин. в течение 5 мин. Далее удаляли верхнюю фазу, а нижнюю выпаривали на водяной бане до полного испарения.

Разделение основных классов фосфолипидов. Разделение ФЛ проводили с помощью ТСХ. Получали следующие фракции ФЛ (в порядке возрастания): ЛФЛ, СФМ, ФИ, ФХ+ФС, ФЭА. Система растворителей состояла из смеси хлороформа, метанола, ледяной уксусной кислоты и дистиллированной воды в соотношении 60:25:1:3 соответственно.

Разделение нейтральных липидов. При разделении липидов получали следующие фракции (в порядке возрастания): фосфолипиды (ФЛ), холестерол (ХС), жирные кислоты (ЖК) и эфиры холестерина (ЭХС).

Разделение нейтральных липидов проводили в системе растворителей гексан, диэтиловый эфир, метанол, ледяная уксусная кислота в соотношении 90:20:3:2.

Разделение церамидов. Церамиды разделяли путем двукратной прогонки в разных системах растворителей. Первая система: легкий петролейный эфир - гексан в соотношении 60:20. Вторая система: хлороформ: метанол: ледяная уксусная кислота в соотношении 80:17:13 соответственно.

Разделение проводили на пластинках для ТСХ “SORBFIL”(Россия).

Окрашивание пластинок проводили 10% спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты.

Силикагель, содержащий фосфолипиды, переносили в пробирки из тугоплавкого стекла. Добавляли 1,5 мл концентрированной хлорной кислоты. Прогревали смесь в течение 5 минут при 200 °С, охлаждали, добавляли 5 мл дистиллированной воды и осаждали силикагель центрифугированием в течение 10 минут при 3000 об/мин. Затем в надосадке определяли количество неорганического фосфата.

2.2.4. Изучение асимметрии мембранных фосфолипидов с помощью химических реагентов [199]

Ресуспендировали микросомы (1 – 12 мг по белку) в 5 мл 50мМ трисбуфера (рН 7,4), содержащего 70 мМ раствор сахарозы, 40 мМ раствор бикарбоната Na, 1 мМ раствор MgCl₂ и 2 мМ раствор сукцинат Na.

Добавляли тринитробензолсульфовую кислоту (ТНБС) до конечной концентрации 3 мМ. Икубировали в течение 1 часа при 0° С. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 20% ТХУ.

Силикагель, содержащий ФЛ, переносили в пробирки из тугоплавкого стекла. Под тягой добавляли 0,5 мл концентрированной H₂SO₄ в каждую пробирку. Прогревали смесь в течении 5 мин при 200 С, затем охлаждали, добавляя 4 мл дист. воды и осаждали силикагель центрифугированием в течении 10 мин. при 3000 об./мин. Измеряли оптическую плотность на СФ – 46 при 375 нм. В качестве контроля использовали образец, приготовленный

таким же образом, но не содержащий фосфора. Концентрацию ФЛ выражали в мкг/мг белка.

Показателем трансмембранной асимметрии является соотношение модифицированного ФЭА (м-ФЭА) к сумме м-ФЭА и общего ФЭА (оФЭА) на наружной и внутренней сторонах мембраны (м-ФЭА/ оФЭА).

2.2.5. Определение активности сфингомиелиназы [22, 232].

Метод основан на избирательном гидролизе сфингомиелиназой сфингомиелина, в результате образуется церамид и фосфорная кислота. Активность сфингомиелиназы оценивают по убыли субстрата. В качестве субстрата использовали сфингомиелин фирмы "ICN Biomedical". Ход работы представлен в таблице 4.

Таблица 4

Ход работы по определению активности сфингомиелиназы

Реактивы	контроль	опыт	холостая
Мембраны лимфоцитов	0 мл	0,2 мл	0,2 мл
0,9% р-р NaCl	0,2 мл	0 мл	0 мл
1мМ р-р ЭДТА	0,2 мл	0,2 мл	0,2 мл
10 мМ р-р MgCl ₂	0,2 мл	0,2 мл	0,2 мл
Трис-HCl, 50 мМ рН 7,1	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл
Тритон X-100 2% р-р	0,2 мл	0,2 мл	0,2 мл
Сфингомиелин 2 мМ	0,5 мл	0,5 мл	0 мл

Обе пробы инкубировали при 37⁰С 30 минут. Гидролиз останавливали 3 мл. смеси хлороформ : метанол (2:1). Фракции фосфолипидов оценивали методом тонкослойной хроматографии. Фракцию сфингомиелина элюировали HClO₄ и количество определяли по фосфору.

Активность сфингомиелиназы выражали в мМР/мин.мг.белка.

$A_{\text{сфм}}$ (мМ/мин мг белка) = $P_k - (P_o + P_x)$, где:

$A_{\text{СФМ}}$ - активность СФМ, P_0 – количество фосфора фракции сфингомиелина в опытной пробе, P_k - соответственно в контрольной пробе, P_x - соответственно в холостой пробе.

2.2.6. Определение активности фосфолипазы A_2 [22]

Принцип метода основан на избирательном гидролизе фосфолипидом A_2 фосфатидилхолина, в результате чего образуется жирная кислота и лизофосфатидилхолин, определение которого проводили с помощью тонкослойной хроматографии.

Субстратная смесь состояла из фосфатидилхолина (10 мг/мл) ("ICN Biomedicals"). Рабочий раствор готовили из 0,22 М NaCl, 0,01 М CaCl₂ на трис-HCl-буферном растворе с pH=7,4.

Ход работы представлен в таблице 5.

Таблица 5

Ход работы по определению активности фосфолипазы A_2

Реактив	Контроль	Опыт	Холостая проба
Ферментный препарат (мембраны лимфоцитов)	0,1 мл	0,1 мл	-
Субстратная смесь	-	0,2 мл	0,2 мл
Рабочий раствор	0,7 мл	0,5 мл	0,6 мл

Пробы перемешивали встряхиванием и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Затем добавляли 1 мл 40 мМ ЭДТА. Ферментативный гидролиз останавливали через 5 мин добавлением 3 мл хлороформ – метаноловой смеси (2:1). Через 5 мин добавляли 0,1 мл 0,1н HCl. Пробирки оставляли на 15 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали 15 мин при 3000об/мин. Убирали верхнюю фазу, а в нижнюю фазу добавляли 1/5 объема 50 мМ CaCl₂. Через 15 мин эту смесь центрифугировали при 1500 об/мин в

течение 5 минут. Далее удаляли верхнюю фазу, а нижнюю выпаривали на водяной бане до полного испарения.

Фракции фосфолипидов оценивали методом ТСХ. Фракцию лизофосфолипидов элюировали HClO_4 и определяли фосфор по Бодански.

Активность фосфолипазы A_2 выражали в мМР/мин мг белка.

2.2.7. Определение активности фосфолипазы D [22]

Принцип метода основан на избирательном гидролизе фосфолипазой D фосфатидилхолина в результате чего образуется свободный холин и фосфатидная кислота, определение которой проводили с помощью тонкослойной хроматографии.

Ход работы представлен в таблице 6.

Таблица 6

Ход работы по определению активности фосфолипазы D

Реактивы	Холостая проба	Опыт	Контроль
0,17 М Na-ацетатный буфер, pH=5,6	1,5 мл	1,5 мл	1,5 мл
1,6 мМ CaCl_2	0,2 мл	0,2 мл	0,2 мл
Фосфатидилхолин (10 мг/мл)	0,15 мл	0,15 мл	-
Ферментный препарат (мембраны лимфоцитов)	-	0,1 мл	0,1 мл
0,9 % NaCl	0,1 мл	-	0,2 мл
Диэтиловый эфир	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл

Пробы инкубировали 30 мин при 37°C , постоянно помешивая. Ферментативный гидролиз останавливали добавлением 3 мл холодного раствора хлороформ : метанол (2 : 1). Фракции фосфатидной кислоты оценивали методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей, которая состояла из смеси P_1 (ацетон : петролейный эфир (1 : 3)) и P_2 (хлороформ : метанол : ледяная уксусная кислота : вода (80 : 13 : 8 : 0,3)).

Фракцию фосфатидной кислоты элюировали и определяли фосфор по Бодански. Активность фосфолипазы D выражали в мМР/мин мг белка.

2.2.8. Определение активности процессов перекисного окисления липидов

2.2.8.1. Определение содержания ТБК – активных продуктов в плазматических мембранах лимфоцитов и сыворотке крови [92]

Принцип метода: при нагревании в кислой среде часть продуктов ПОЛ, относящихся к классу эндоперекисей, разлагается с образованием ТБК – активных продуктов, взаимодействие которых с двумя молекулами тиобарбитуровой кислоты приводит к формированию окрашенного в розовый цвет комплекса.

Инкубационная смесь, содержащая 50 мМ трис-НСl буфер рН 7,4 и сыворотку крови (или взвесь ПМ лимфоцитов) в количестве 1-10 мг белка в мл, помещалась в термостат ($t=37$) на 30 мин. В качестве прооксиданта использовали 10^{-6} М раствор $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Реакцию останавливали добавлением 1,0 мл 20% раствора ТХУ, приливали по 1,0 мл трис-НСl буфера, 0,8% раствора ТБК. Смесь нагревали на кипящей бане 20 мин. Супернатант отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об/мин. Оптическую плотность измеряли при 532 нм. Количество ТБК – активных продуктов рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции $k=1,56 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$:

$$C_{(\text{мкмоль/мг белка})} = E \cdot V / (k \cdot V_1 \cdot a),$$

$$C_{(\text{мкмоль/г белка})} = E \cdot V / (k \cdot V),$$

где E-экстинкция пробы, V-объем пробы, л; V_1 -объем сыворотки, л; a-концентрация белка, г/л.

2.2.8.2. Определение активности каталазы в плазматических мембранах лимфоцитов и сыворотке крови [92]

Принцип метода основан, на способности H_2O_2 образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. К 2,0 мл 0,03% раствора перекиси

водорода добавляли 0,1 мл сыворотки (предварительно разведенной в 10 раз) (0,1 мл взвеси ПМ лимфоцитов в количестве 1-10 мг белка в мл). В холостую пробу- 0,1 мл дистиллированной воды. После 10 мин инкубации приливали по 1,0 мл 4% раствора молибдата аммония. Оптическую плотность измеряли при длине волны 410 нм. Активность каталазы в ПМ лимфоцитов:

$$A_{\text{кат}}(\text{мкат/мг.белка}) = (E_{\text{хол}} - E_{\text{опыт}}) \cdot V \cdot t \cdot K / C$$

где, $E_{\text{хол}}$ и $E_{\text{опыт}}$ - экстинкции холостой и опытной проб соответственно, V - объем вносимой пробы, t - время инкубации в секундах, K - коэффициент молярной экстинкции H_2O_2 , равный $22,2 \cdot 10^3 \text{ мМоль}^{-1} \text{ см}^{-1}$, C - количество белка в пробе в миллиграммах.

Активность каталазы в сыворотке крови рассчитывали по формуле:

$$A_{\text{кат}}(\text{мкат/г.белка}) = (E_{\text{хол}} - E_{\text{опыт}}) \cdot V \cdot t \cdot K / C$$

где, $E_{\text{хол}}$ и $E_{\text{опыт}}$ - экстинкции холостой и опытной проб соответственно, V - объем вносимой пробы, t - время инкубации в секундах, K - коэффициент молярной экстинкции H_2O_2 , равный $22,2 \cdot 10^3 \text{ мМоль}^{-1} \text{ см}^{-1}$, C - количество белка в пробе в граммах.

2.2.8.3. Определение активности супероксиддисмутаза в плазматических мембранах лимфоцитов и сыворотке крови [92]

Метод оценки активности супероксиддисмутаза основан на способности данного фермента ингибировать автоокисление адреналина. Адреналин в сильно щелочной среде подвергается автоокислению, в результате которого образуется O_2^{\bullet} , опосредующий процесс автоокисления. Супероксиддисмутаза, дисмутируя O_2^{\bullet} до перекиси и молекулярного кислорода, ингибирует, тем самым, процесс образования адrenoхрома из адреналина. Таким образом, степень ингибирования автоокисления адреналина прямо пропорциональна активности СОД в исследуемом образце. Для измерения активности СОД в кювету спектрофотометра вносили компоненты в следующей последовательности: 3,0 мл 0,05 М NaHCO_3 карбонатного буфера рН 10,2; содержащего 0,05 М раствор ЭДТА; 0,1 мл сыворотки, предварительно разведенной в 10 раз (0,1 мл взвеси ПМ

лимфоцитов в количестве 1-10 мг белка в мл) (или 0,1 мл дистиллированной воды, если измеряется холостая проба); 0,5мл $1,8 \cdot 10^{-3}$ М водного раствора адреналина рН 2,5 (готовится extempore). Сначала записывали скорость свободного не ингибированного автоокисления адреналина в адренохром (V_1) при длине волны 489 нм. Затем определяли скорость автоокисления адреналина в присутствии СОД исследуемого материала (V_2).

Активность СОД сыворотки, разведенной в n раз, определяли:

$$A_{\text{(усл. ед/л)}} = ((V_1/V_2-1) \cdot n).$$

Активность СОД в ПМ лимфоцитов:

$$A_{\text{(усл. ед/мг белка)}} = ((V_1/V_2-1) \cdot n/a), \text{ где } a\text{-концентрация белка, мг/л.}$$

2.2.9. Определение активности протеолитических процессов

2.2.9.1. Определение активности трипсина в сыворотке крови [166]

Принцип метода основан на способности трипсина сыворотки гидролизовать синтетический субстрат БАПНА (N-бензоил-L-аргинина-p-нитроанилид) с образованием p-нитроанилида, который обладает оптической активностью при 410 нм. Ход работы: К 0,5 мл сыворотки, разведенной в 2 раза физиологическим раствором добавляют 4 мл 0,02% раствора БАПНА и инкубируют при 37°С в течение 30 минут. Реакцию останавливают добавлением 1 мл 30% раствора уксусной кислоты. В контрольной пробе реакцию останавливают до инкубации. Затем измеряют оптическую плотность опытной пробы против контрольной при 410 нм.

Активность трипсина выражают в миллиеденицах (МЕ) и рассчитывают по формуле:

$$A_{\text{тр}} (\text{МЕ/мл}) = (E_{\text{оп}} - E_{\text{кон}}) \cdot 33,3 / C,$$

где $E_{\text{оп}}$, $E_{\text{кон}}$ – оптическая плотность опытной и контрольной проб, 33,3 – расчетный коэффициент, C – концентрация p-нитроанилида, соответствующая 1 единице оптической плотности рассчитанному по калибровочной кривой. Построение калибровочного графика проводят по таблице 7.

Таблица 7

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0,1 мкМ п-нитроанилида	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
H ₂ O	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	0
C (мкМ)	0	0,05	0,01	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5

2.2.9.2. Определение содержания плазминогена в плазме крови [14]

Принцип метода: при добавлении стрептокиназы к разведенному образцу исследуемой плазмы образуется плазминоген – стрептокиназный комплекс, который обладает способностью расщеплять хромогенный субстрат. Скорость гидролиза нитроанилиновой связи хромогенного субстрата зависит от концентрации плазминогена. Регистрируют изменение оптической плотности на фотометре при длине волны 405 нм после добавления уксусной кислоты (двухточечный метод). Исследование проводили с использованием набора реагентов "ХромоТех-Плазминоген" фирмы "Технология-Стандарт", Россия.

Результаты анализа выражают в процентах к норме. Концентрацию плазминогена (С) вычисляют по формуле:

$$C_{\text{исслед. образца}} (\%) = (A_{\text{исслед. образца}} - A_{\text{бланка}}) * \text{ФП}$$

$$\text{ФП} = C_{\text{контрольной плазмы}} (\%) / A_{\text{контрольной плазмы}} - A_{\text{бланка}}$$

где: $A_{\text{исслед. образца}}$ – поглощение пробы с исследуемым образцом плазмы,

$A_{\text{контрольной плазмы}}$ - поглощение пробы с контрольной плазмой, $A_{\text{бланка}}$ – поглощение бланка, ФП – фактор пересчета, $C_{\text{контрольной плазмы}} (\%)$ – концентрация плазминогена в контрольной плазме.

2.2.9.3. Определение содержания растворимых фибринмономерных комплексов в плазме крови [142]

Тест основан на оценке времени появления в исследуемой бедной тромбоцитами цитратной плазме, содержащей РФМК, хлопьев (зерен) фибрина после добавления к ней орто-фенантролина.

Исследование проводили с помощью диагностикума “РФМК-тест” фирмы “Технология-Стандарт”, Россия.

Тест считается положительным, если в плазме в течение 150 сек. регистрируются хорошо видимые в проходящем свете хлопья или зерна паракоагулянта. Отмечают время их появления в секундах и по таблице, построенной на основе калибровочного графика, определяют количество РФМК в исследуемой плазме.

2.2.9.4. Определение активности α_1 – протеиназного ингибитора в плазме крови [148]

Метод основан на способности α_1 – протеиназного ингибитора плазмы крови тормозить расщепление синтетического субстрата N-бензоил- L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ) трипсином. Ход работы представлен в таблице 8:

Таблица 8

Реактивы	Опыт 1	Опыт 2	Контроль
0,05 М трис-HCL буфер рН=8,0	1,9 мл	1,8 мл	2,0 мл
0,01% р-ор трипсина "ICN Biomedicals"	0,1 мл	0,1 мл	-
плазма, разведенная в 50 раз	-	0,1 мл	-

Инкубация 5 минут при 25° С

1,5 мМ р-ор БАЭЭ	1,0 мл	1,0 мл	1,0 мл
------------------	--------	--------	--------

Измеряют прирост оптической плотности при 253 нм на СФ – 46.

Активность α_1 – протеиназного ингибитора выражают в условных ингибиторных единицах и рассчитывают по формуле:

$$A (\text{ИЕ/мл}) = V_1 - V_2 * 2,73 * 50 / 0,1$$

где: V_1 , V_2 - скорость гидролиза БАЭЭ трипсином за минуту в 1 и 2 опытной пробе, 2,73 - расчетный коэффициент, 0,1 – количество плазмы крови, взятой для анализа, 50 – фактор разведения плазмы крови.

2.2.9.5. Определение активности α_2 – макроглобулина в плазме крови [148]

Принцип метода основан на способности комплекса α_2 – МГ с трипсином гидролизовать БАЭЭ, что выражается в увеличении оптической плотности раствора при 253 нм

Ход работы: К 1,75 мл 0,05 М трис-НСL буфера (рН=8,0) добавляют 0,1 мл разведенной в 10 раз плазмы крови и 0,05 мл 0,1% раствора трипсина, инкубируют 5 минут при 25°С для образования комплекса α_2 –МГс трипсином и несвязавшийся трипсин ингибируют добавлением 0,1 мл 0,3% раствора ингибитора трипсина из сои фирмы "ICN Biomedicals". Через 5 минут добавляют 1 мл раствора БАЭЭ, перемешивают и измеряют, прирост оптической плотности на СФ-46 при 253 нм в течение 10 минут. Активность α_2 –МГ выражают в условных ингибиторных единицах и рассчитывают по формуле:

$$A \text{ (ИЕ/мл)} = E_{253} * 2,73 * 10 / 0,1 * 10$$

где: E_{253} - прирост оптической плотности в пробе при 253 нм в течение 10 минут, 2,73 – расчетный коэффициент, 10 – время измерения (мин), 0,1 – количество плазмы взятой для анализа (мл), 10 – фактор разведения плазмы.

2.2.9.6. Определение активности антитромбина – III в плазме крови [14]

Метод предназначен для выявления снижения активности плазменного антитромбина. Принцип метода: АТ III разведенной исследуемой плазмы в присутствии гепарина быстро инактивирует тромбин. Остаточная активность тромбина определяется по скорости гидролиза хромогенного субстрата фотометрически. Регистрируют изменение оптической плотности (поглощения) на фотометре при длине волны 405 нм после добавления уксусной кислоты (двухточечный метод). Определение активности

антитромбина проводили при помощи набора реагентов “ХромоАнтитромбин-тест” фирмы “Технология-Стандарт”, Россия.

Результаты анализа выражают в процентах к норме. Концентрацию АТ III вычисляют по формулам:

$$\text{АТ III (\%)} = (A_{\text{кзат}} - A_{\text{образца}}) * \text{ФП}$$

$$\text{ФП, \%} = \text{АТ III}_{\text{контрольной плазмы}} (\%) / A_{\text{кзат}} - A_{\text{контрольной плазмы}}$$

где: $A_{\text{кзат}}$ – поглощение в пробе с контрольным значением активности тромбина, $A_{\text{образца}}$ – поглощение в исследуемом образце плазмы больного, ФП – фактор пересчета, $\text{АТ III}_{\text{контрольной плазмы}} (\%)$ – известное содержание АТ III в контрольном образце плазмы, $A_{\text{контрольной плазмы}}$ – поглощение в контрольном образце плазмы.

2.2.10. Определение активности фактора Виллебранда в плазме крови [14]

Определение активности ФВ проводилось на агрегометре Биола (модель LA 230). Метод количественного определения активности ФВ основан на его способности в присутствии антибиотика ристоцетина, вызывать агглютинацию тромбоцитов. Уровень ФВ в исследуемой плазме оценивается по вызываемой этой плазмой агглютинации стандартизированного препарата тромбоцитов. Для количественного определения активности ФВ строится калибровочная кривая. Процентное содержание ФВ в исследуемой плазме определяется по максимальному углу наклона кривой агглютинации.

Повышение уровня ФВ в плазме может являться одним из маркеров повреждения эндотелия сосудистой стенки при различных предтромботических состояниях, тромбозах и т. д.

2.2.11. Определение неорганического фосфата по методу Бодански [102]

Неорганический фосфат с молибденовым реактивом в присутствии аскорбиновой кислоты дает синее окрашивание, интенсивность которого зависит от концентрации фосфора в пробе.

К 1,5 мл центрифугата добавляли 1 мл 1% р-ра аскорбиновой кислоты и 1мл молибденового реактива. Пробу выдерживали 10 мин при комнатной

температуре, после этого колориметрировали в фотоколориметре КФК-3 с красным светофильтром (630 нм). Содержание фосфора в пробах определяли по калибровочному графику.

2.2.12. Микробиуретовый метод определения белка [102]

Метод основан на образовании окрашенного в фиолетовый цвет комплекса, образующегося в результате взаимодействия пептидных связей с Cu^{2+} в щелочной среде.

К 0,2 мл ПМ лимфоцитов, сыворотки или плазмы добавляли 3,5 мл раствора NaOH и 0,2 мл реактива Бенедикта. Выдерживали 15 мин при комнатной температуре и спектрофотометрировали на СФ – 46 при 330 нм. Построение калибровочного графика проводили по стандартному раствору белка.

2.2.13. Статистическая обработка результатов [115]

Статистическую обработку результатов исследования проводили на персональном компьютере с использованием пакета прикладных программ STATGRAPHICS 5.0. Для проверки на нормальность использовался критерий Колмогорова-Смирнова. Поскольку изучаемые выборки не подчинялись нормальному закону распределения и были независимыми, для определения достоверности различий между группами использовался непараметрический двусторонний критерий Манна-Уитни. Для каждого анализируемого показателя вычисляли среднее (\bar{X}), ошибку среднего (m), среднеквадратичное отклонение. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Результаты всех экспериментов приведены в таблицах в виде $\bar{X} \pm m$. Корреляционный анализ проводили с помощью вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изучение липидного состава плазматических мембран лимфоцитов больных опишной наркоманией в состоянии абстиненции до проведения лечения, находившихся на стандартном лечении и лечении, проводимом в комплексе с β -адреноблокатором

Биологическим мембранам принадлежит ключевая роль в обеспечении и регуляции физиологической активности клеток [20, 52, 182]. Отделяя цитоплазму от внешней среды и осуществляя транспорт веществ, мембраны активно участвуют в создании и поддержании клеточного гомеостаза. В настоящее время большинство известных заболеваний рассматривают как состояния, сопряженные с поражением клеточных мембран, поскольку дестабилизация молекулярной ультраструктуры мембран при патологических процессах приводит к потере их функциональной компетентности, изменению жизнедеятельности клеток в целом и даже их гибели [39]. В указанном аспекте значительный интерес представляет накопленный фактический материал, позволяющий трактовать воздействия патогенных факторов на уровне мембран. При этом существенное значение приобретает комплексная оценка ультраструктурных, энзиматических, функциональных параметров мембранных нарушений [182]. С этих позиций нами были проведены исследования липидного спектра плазматических мембран (ПМ) лимфоцитов, особенности, изменения которых в определенной степени отражают характер структурной перестройки в иных мембранных системах [206].

Известно, что лимфоцитарная мембрана представляет собой композитную структуру, основой которой является липидный бислой, пронизываемый интегральными белками, связанными с белковой сетью цитоскелета, примыкающего к цитоплазматической поверхности липидного матрикса [188]. Липидные молекулы, являясь важными структурными и

функциональными компонентами мембран, регулируют подвижность и активность внутримембранных белков, тем самым, обеспечивая в клетке селективную проницаемость и нормальное функционирование мембран - ассоциированных ферментов, а также рецепторного аппарата [52].

Липидный состав биологических мембран играет важную роль в функционировании клеток иммунной системы, формировании и регуляции иммунного ответа. Изменения липидного состава мембран приводят к нарушению функциональной активности лимфоцитов в ответ на митогены [114, 208].

В связи с этим, модификация липидной компоненты мембран закономерно приводит к утрате способности клеток регулировать свой ионный и антиоксидантный гомеостаз, нарушению работы мембран - связанных энзимов, что, в конечном итоге, способствует изменению метаболизма в клетке, а также приводит к необратимым нарушениям ее структурно-функционального статуса [20, 182].

Имеющиеся в настоящее время данные о характере дезорганизации липидного компартмента мембран лимфоцитов у пациентов, страдающих опийной наркоманией, носят весьма фрагментарный характер.

В результате проведенных исследований нами были обнаружены изменения в липидном составе мембран лимфоцитов крови у больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции.

Результаты изучения липидного состава ПМ лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения, находившихся на стандартном лечении, и больных, находившихся на комплексном лечении, представлены в таблицах 9, 10 и на рисунке 5.

Проведенный анализ показал, что в ПМ лимфоцитов крови у практически здоровых лиц содержание ХС составило $23,6 \pm 0,8$ мМР/мг белка, что достоверно ниже в 2,6 раза ($p < 0,05$) аналогичного показателя у больных группы 1, в 2,2 раза ($p < 0,05$) у больных группы 2 и в 1,6 раза ($p < 0,05$) аналогичного показателя у больных группы 3 соответственно. Было

выявлено достоверное различие в содержании ХС у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Содержание ЭХ в ПМ лимфоцитов крови у практически здоровых лиц составило $62,6 \pm 5,8$ мМР/мг белка, что достоверно выше в 2,2 раз ($p < 0,05$) аналогичного показателя у больных группы 1, в 1,7 раз ($p < 0,05$) у больных группы 2 и в 1,2 раза ($p < 0,05$) аналогичного показателя у больных группы 3. Было выявлено достоверное различие в содержании ЭХ в ПМ лимфоцитов у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Содержание ФЛ в первой, второй и третьей группах больных достоверно не отличалось от содержания ФЛ в группе контроля.

В группе здоровых доноров содержание ЛФЛ в ПМ лимфоцитов составило $1,5 \pm 0,1$ мМР/мг белка. В группе больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения содержание ЛФЛ было достоверно повышено в 19 раз ($p < 0,05$), в группе больных, находившихся на стандартном лечении, содержание ЛФЛ достоверно повышено в 15 раз ($p < 0,05$), в третьей группе данный показатель был достоверно повышен в 7 раз ($p < 0,05$). Было выявлено достоверное различие в содержании ЛФЛ у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Содержание СФМ в ПМ лимфоцитов контрольной группы составило $27,5 \pm 1,8$ мМР/мг белка, что было достоверно ниже в 1,2 раза аналогичного показателя у больных группы 1 и группы 2 ($p < 0,05$). В группе 3 содержание СФМ достоверно не отличалось от аналогичного показателя в группе здоровых лиц. Было выявлено достоверное различие в содержании СФМ у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Содержание ФИ в ПМ лимфоцитов контрольной группы составило $20,8 \pm 1,5$ мМР/мг белка. В первой, второй и третьей группе больных данный показатель достоверно не отличалось от аналогичного показателя в группе контроля.

В ПМ лимфоцитов контрольной группы содержание сумарной фракции ФХ+ФС составило $50,3 \pm 2,2$ мМР/мг белка. В группе 1 (до начала лечения)

этот показатель достоверно превысил контрольный уровень в 2,0 раза ($p < 0,05$), и в 1,6 раза ($p < 0,05$) в группе 2 (на стандартном лечении). В группе 3 (на комплексном лечении) содержание ФХ+ФС достоверно не отличалось от контроля. Было выявлено достоверное различие в содержании ФХ + ФС у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Содержание ФЭА в ПМ лимфоцитов контрольной группы составило $45,0 \pm 2,1$ мМР/мг белка, что достоверно превышало аналогичный показатель в группе 1 в 1,5 раза ($p < 0,05$), в группе 2 в 1,3 раза ($p < 0,05$). В группе 3 содержание ФЭА достоверно не отличалось от контрольного значения. Было выявлено достоверное различие в содержании ФЭА у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Уровень церамидов в ПМ лимфоцитов контрольной группы составил $13,1 \pm 0,5$ мМР/мг белка, что достоверно превышало аналогичный показатель в группе 1 в 3,2 раза ($p < 0,05$), в группе 2 в 2,8 раза ($p < 0,05$). В группе 3 содержание церамидов достоверно не отличалось от аналогичного показателя в группе здоровых доноров. Было выявлено достоверное различие в содержании церамидов в ПМ лимфоцитов у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Содержание нейтральных липидов (мМР/мг белка) в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), находившихся на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) ($X \pm m$)

Наименование показателя	Группа контроля n=25	Группа 1 n=75	Группа 2 n=41	Группа 3 n=34
Холестерин	23,6 ± 0,8	60,9 ± 4,3*	52,5 ± 5,3*	37,7 ± 1,4*°
Эфиры холестерина	62,6 ± 5,8	28,0 ± 2,4*	37,5 ± 3,8*	54,0 ± 1,5*°

Примечание: n – количество обследованных. * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$); ° - достоверное изменение между группой 2 и группой 3 ($p < 0.05$)

Таблица 10

Содержание фосфолипидов (мМР/мг белка) в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), находившихся на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) ($X \pm m$)

Наименование показателя	Группа контроля n=25	Группа 1 n=75	Группа 2 n=41	Группа 3 n=34
Фосфолипиды	33,8 ± 3,4	31,1 ± 2,6	30,0 ± 3,0	31,7 ± 1,4
ЛФЛ	1,5 ± 0,1	28,8 ± 2,6*	22,5 ± 3,2*	10,5 ± 0,9*°
СФМ	27,5 ± 1,8	31,1 ± 1,4*	32,1 ± 0,6*	24,0 ± 1,2°
ФИ	20,8 ± 1,5	21,6 ± 1,4	20,3 ± 1,4	20,3 ± 0,9
ФХ + ФС	50,3 ± 2,2	100,0 ± 6,1*	80,0 ± 3,4*	55,5 ± 2,7°
ФЭА	45,0 ± 2,1	30,5 ± 2,1*	35,3 ± 1,6*	42,7 ± 2,1°
Церамиды	13,1 ± 0,5	4,1 ± 0,6*	4,70 ± 0,27*	11,4 ± 0,3°

Примечание: n – количество обследованных. * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$); ° - достоверное изменение между группой 2 и группой 3 ($p < 0.05$)

ЛФЛ – лизофосфолипиды, СФМ – сфингомиелин, ФИ – фосфатидилинозитол, ФХ + ФС – суммарная фракция фосфатидилхолина и фосфатидилсерина, ФЭА - фосфатидилэтаноламин

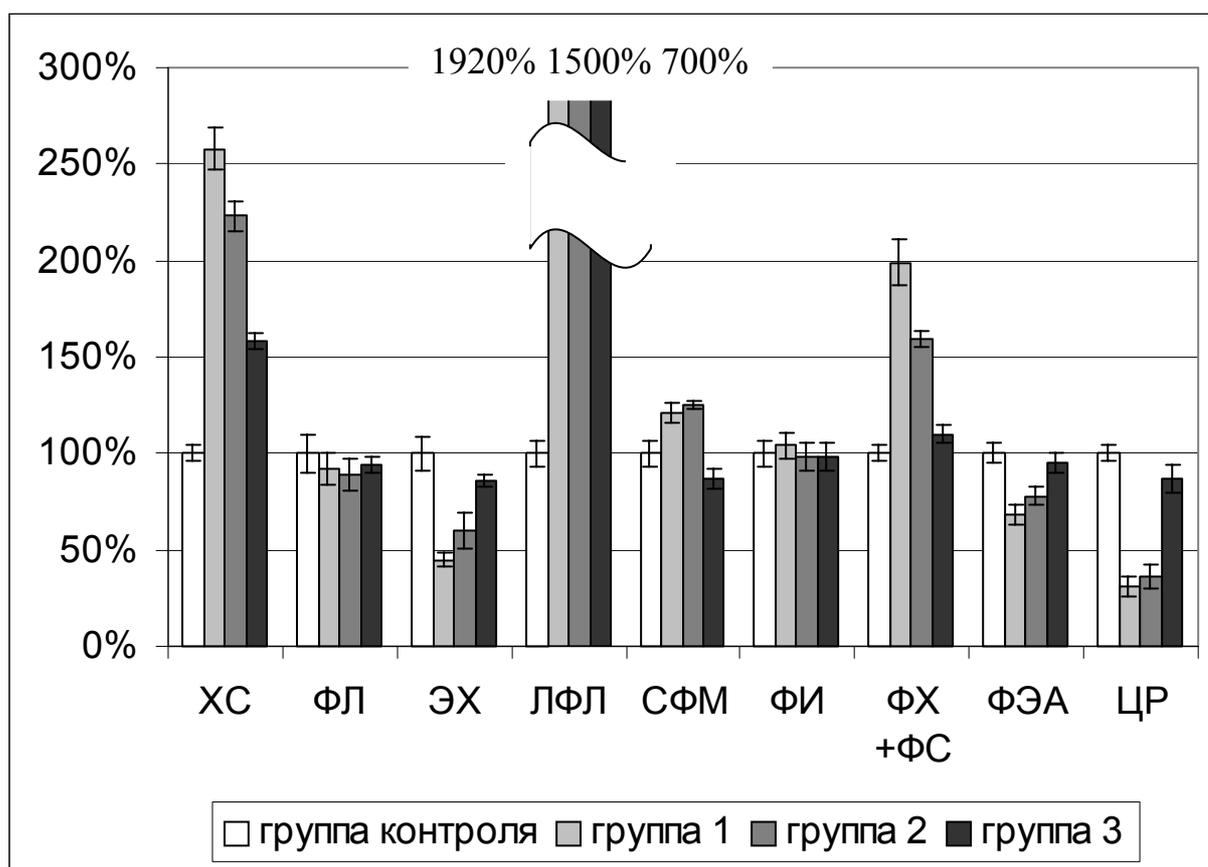


Рис. 5. Отдельные фракции липидов в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) (в % к контролю)

Результаты изучения отношений ХС/ФЛ в ПМ лимфоцитов представлены в таблице 11 и рисунке 6.

Отношение ХС/ФЛ в группе здоровых лиц составило $0,70 \pm 0,12$, что было достоверно ниже аналогичного показателя в группе 1 в 2,8 раза ($p < 0,05$), в группе 2 в 2,5 раза ($p < 0,05$). В группе 3 отношение ХС/ФЛ достоверно превышало аналогичный показатель в контрольной группе в 1,7 раза ($p < 0,05$). Было выявлено достоверное различие в отношении ХС/ФЛ в ПМ лимфоцитов у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Результаты изучения показателя трансмембранной асимметрии (отношение мФЭА/оФЭА) ПМ лимфоцитов крови представлены в таблице 11 и на рисунке 7.

Отношение мФЭА/оФЭА в ПМ лимфоцитов крови здоровых лиц составило $0,37 \pm 0,03$. У пациентов группы 1 (до лечения) данный показатель был достоверно снижен в 2,3 раза по сравнению с аналогичным показателем группы контроля ($p < 0,05$), у пациентов группы 2 (на стандартном лечении) данный показатель был достоверно снижен в 1,8 раза по сравнению с группой здоровых доноров ($p < 0,05$). В группе 3 (на комплексном лечении) отношение мФЭА/оФЭА достоверно не отличалось от аналогичного показателя в группе контроля. Было выявлено достоверное различие в отношении мФЭА/оФЭА в ПМ лимфоцитов у больных опишной наркоманией группы 2 и группы 3.

Таблица 11

Отношение отдельных фракций липидов в плазматических мембранах лимфоцитов больных опишной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), находившихся на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) ($X \pm m$)

Наименование показателя	Группа контроля n=25	Группа 1 n=75	Группа 2 n=41	Группа 3 n= 34
ХС/ФЛ	$0,70 \pm 0,12$	$1,95 \pm 0,21^*$	$1,75 \pm 0,19^*$	$1,19 \pm 0,05^{*\circ}$
мФЭА/оФЭА	$0,37 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,02^*$	$0,21 \pm 0,01^*$	$0,31 \pm 0,02^\circ$

Примечание: n – количество обследованных. * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$); ° - достоверное изменение между группой 2 и группой 3 ($p < 0.05$); ХС – холестерин, ФЛ – фосфолипиды, оФЭА - общий фосфатидилэтаноламин, мФЭА – модифицированный фосфатидилэтаноламин

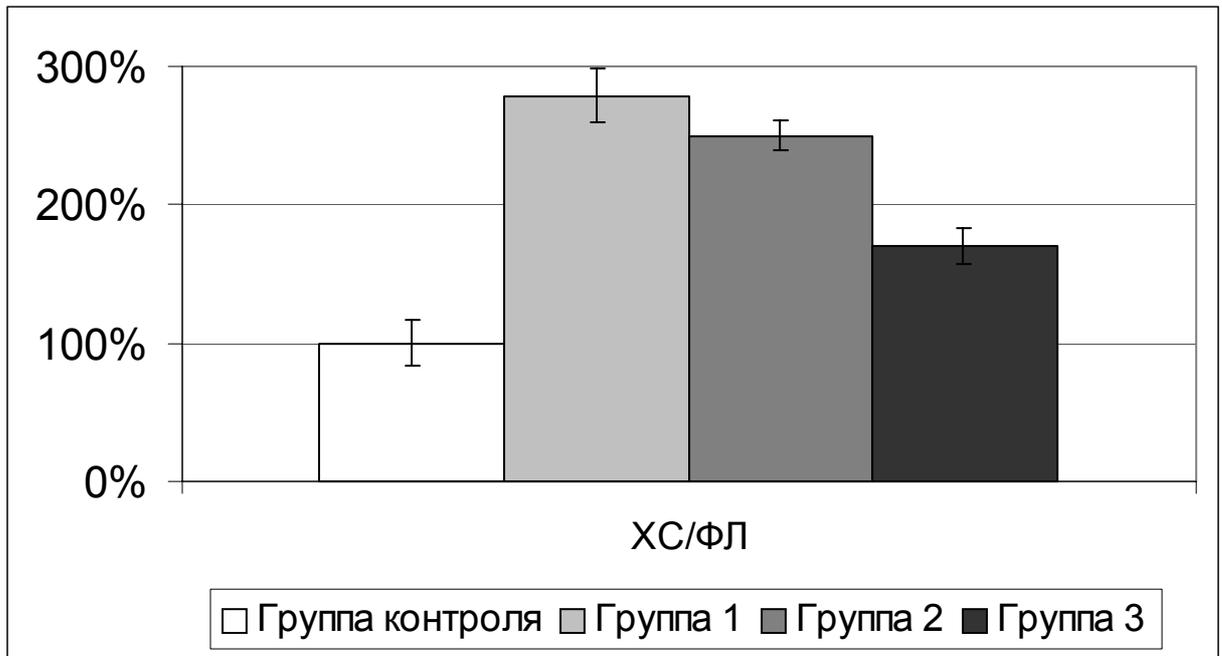


Рис.6. Отношение холестерина к фосфолипидам в плазматических мембранах лимфоцитов больных опишной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) (в % к контролю)

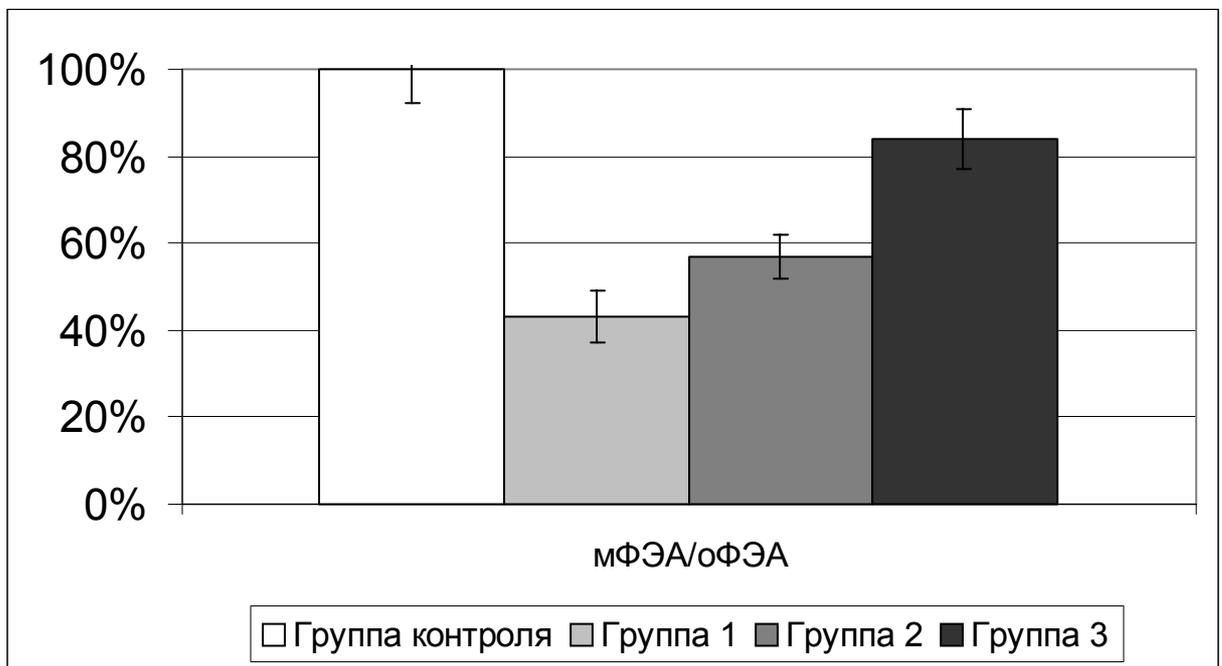


Рис.7. Показатель трансмембранной асимметрии в плазматических мембранах лимфоцитов больных опишной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) (в % к контролю)

Таким образом, полученные данные позволяют утверждать, что в плазматических мембранах лимфоцитов крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до начала лечения и, находившихся на стандартном лечении, наблюдаются существенные изменения, что проявляется повышением содержания ФХ + ФС, СФМ, ЛФЛ и ХС и снижением содержания ФЭА, церамидов и ЭФХ. Выявлено нарушение отношений ХС/ФЛ и мФЭА/оФЭА.

У больных, находившихся на стандартном лечении в комплексе с β -АБ, нарушения в липидном составе мембран лимфоцитов менее выражены, что проявлялось достоверно меньшим нарушением уровня ХЛ, ЛФЛ, ЭФХ и достоверно менее выраженным нарушением отношения ХС/ФЛ по сравнению с аналогичными показателями в группе больных опийной наркоманией, находившихся на стандартной схеме лечения. Не выявлено достоверных нарушений в содержании СФМ, церамидов, суммарного содержания ФХ и ФС. Показатель трансмембранной асимметрии (мФЭА/оФЭА) достоверно не изменен.

В связи с тем, что холестерин является важным структурным компонентом плазматических мембран, его накопление, безусловно, чревато увеличением микровязкости бислоя, изменением латеральной диффузии рецепторов, нарушением ионного транспорта, что делает мембрану лимфоцитов менее приспособленной к выполнению своих функций [40, 94, 214]. С другой стороны увеличение содержания холестерина в мембранах стабилизирует липидный бислой и ограничивает проницаемость мембран для Ca^{2+} [208]. Однако при избыточном накоплении холестерина постепенно ухудшается микровязкость липидного бислоя клеточных мембран, что отрицательно сказывается на функциональных свойствах Na,K-и Ca-АТФ-азы [84].

Выявленное обогащение мембран лимфоцитов холестерином может явиться следствием активации перекисного окисления липидов, поскольку

свободный холестерол, выступая в роли антиоксиданта, способен ингибировать пероксидацию структурированных липидов за счет ограничения молекулярной подвижности жирнокислотных остатков фосфолипидных молекул и его накопление в мембранах делает их более устойчивыми к действию свободных радикалов [50, 81, 96]. Для функциональной активности лимфоцитов существенное значение имеет соотношение общего холестерина и фосфолипидов, по которому можно судить о подвижности клеток [84]. Повышение этого соотношения в лимфоцитах крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции связано с накоплением холестерина в мембранах клеток и указывает на ограничение подвижности лимфоцитов крови.

Изменения липидного состава мембран лимфоцитов, возможно, вызваны смещением метаболических превращений липидов на новый патологический уровень и, без сомнения, отражается на функционировании клеток. Известно, что повышение содержания холестерина ведет к снижению цитотоксичности естественных киллеров, за счет ограничения продукции цитотоксического фактора. Повышение вязкости мембраны вследствие накопления холестерина в ней, уменьшает устойчивость клеток-мишеней к действию клеток-киллеров [84].

Являясь важным структурным компонентом плазматических мембран, фосфолипиды регулируют активный и пассивный трансмембранный транспорт веществ, определяют чувствительность клеток к действию лигандов, детерминируют активность мембраносвязанных ферментных систем, участвуют в процессах свертывания крови [3, 30, 77, 149].

Помимо этого, показана иммуностимулирующая активность мембранных фосфолипидов, в частности, появление фосфатидилсерина в наружном монослое мембран является триггером для макрофагального удаления эритроцитов из кровотока. Наряду с этим, кефалины и лецитины, влияя на стволовые клетки, увеличивают образование очагов кроветворения [88, 109]. В связи с этим, поддержание соотношения между фракциями

фосфолипидов на физиологическом уровне является неременным условием нормального функционирования клеток.

Проведенный нами анализ фосфолипидного спектра плазматических мембран лимфоцитов у больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома на стандартном лечении, показал отчетливое снижение уровня легкоокисляемой фракции фосфатидилэтаноламина. Поскольку фосфатидилэтаноламин играет важную роль в регуляции активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы, уменьшение его содержания в мембранах может приводить к нарушению внутриклеточного ионного гомеостаза. Кроме того, закономерным результатом уменьшения уровня фосфатидилэтаноламина, богатого полиненасыщенными жирными кислотами, является снижение антиокислительной активности липидов мембран лимфоцитов, что приводит к нарушению стационарного уровня перекисного окисления липидов. Также снижение содержания фосфатидилэтаноламина в мембранах лимфоцитов крови можно объяснить синтезом фосфатидилсерина из фосфатидилэтаноламина. Кроме того, фосфатидилэтаноламин является метаболическим предшественником фосфатидилхолина. Как было показано выше (табл. 10), содержание суммарной фракции ФХ и ФС в плазматических мембранах лимфоцитов больных первой и второй группы увеличено. Кроме того, фосфатидилэтаноламин является основным субстратом для перекисного окисления липидов [16].

Повышенное содержание фосфатидилхолина увеличивает поступление Ca^{2+} в клетки, что приводит к активации фосфолипазы A_2 и освобождению арахидоновой кислоты из фосфатидилхолина.

Известно, что фосфатидилхолин изменяет плотность поверхностного заряда мембраны, поэтому увеличение его содержания повышает чувствительность клеток-мишеней к лизису, так как облегчает их контакт с киллерами. Кроме того, фосфатидилхолин богат насыщенными жирными кислотами [143]. Поэтому увеличение содержания этого фосфолипида в

плазматической мембране лимфоцитов крови ведет к увеличению жесткости мембраны. Это связано с тем, что насыщенные жирные кислоты, в отличие от ненасыщенных, обладают меньшей подвижностью [235]. Холестерин обладает высоким сродством к холинсодержащим фосфолипидам фосфатидилхолину и сфингомиелину [206].

В связи с этим можно предположить, что повышение содержания в мембране лимфоцитов данных фосфолипидов приведет к последующему отсроченному увеличению содержания холестерина во внешнем монослое мембраны клеток, что еще более увеличит микровязкость мембраны. При проведении корреляционного анализа между содержанием ФХ и ХС в первой и второй группах больных была выявлена прямая достоверная зависимость между этими параметрами ($r = 0,47$, $P < 0,05$) и ($r = 0,32$, $P < 0,05$) соответственно. Это доказывает, что увеличение содержания ФХ в мембране лимфоцитов приводит к увеличению содержания ХС. Кроме того, благодаря асимметричному расположению этих фосфолипидов в бислое мембраны изменение их соотношения может существенно влиять на величину липидных монослоев, от которых зависят формы и физические свойства лимфоцитов [84].

Так как в молекуле сфингомиелина присутствуют в основном остатки насыщенных жирных кислот, то увеличение его содержания в свою очередь способствует повышению микровязкости липидного бислоя мембраны, его ригидности, что также может привести к снижению активности мембрансвязанных ферментов (5'-нуклеотидазы, Na,K-АТФазы). Снижение активности 5'-нуклеотидазы приводит к нарушению функций транспорта аденозина в клетки, дефицит которого является причиной функциональной недостаточности лимфоцитов.

Отмеченное нами накопление лизофосфолипидов в плазматических мембранах лимфоцитов больных всех трех групп чревато переходом липидного бислоя в монослой, активацией проницаемости мембраны для Na^+ и K^+ , солюбилизацией ферментов [39, 53, 77]. Образование лизолецитина –

известного эхиноцитарного агента, может быть обусловлено повышением активности Ca^{2+} -зависимого фермента фосфолипазы A_2 , катализирующего гидролиз фосфолипидов по положению sn-2 [52]. Другим потенциальным механизмом повышенного образования лизоформ фосфолипидов может являться снижение активности лизофосфолипазы [53].

Биологические мембраны обладают функциональной асимметрией, поскольку они разделяют различные клеточные компартменты. В настоящее время установлено, что асимметрия отражается в различном распределении липидов и других компонентов мембраны между двумя поверхностями двойного липидного слоя. Исследования липидного состава эритроцитов у разных видов показали, что общая доля холинсодержащих ФЛ всегда остается равной около 50% [154]. Исследования асимметрии показали, что в эритроцитах человека холинсодержащие ФЛ преобладают на наружной поверхности двойного слоя, тогда как ФЭА, ФС и ФИ связаны преимущественно с его внутренней поверхностью. ХС так же распределен асимметрично и локализуется, главным образом, во внешнем монослое мембраны эритроцита [20, 154]. Различное сродство ХС к фосфолипидам разных классов может обуславливать его неравномерное распределение в биомембранах.

В настоящее время установлен следующий порядок сродства ХС к нейтральным фосфолипидам: СФМ > ФХ > ФЭА; сродство к полярным фосфолипидам значительно варьирует при изменении их жирно-кислотного состава. Распределение ХС в биомембранах так же зависит от скорости латеральной и трансбислойной («флип-флоп») диффузии фосфолипидов. Как показано на модельных системах, ХС обуславливает стабилизацию бислойной структуры, воздействуя на системы с насыщенными и ненасыщенными фосфатидилхолинами, однако в случае ненасыщенных фосфатидилэтаноламинов способствует образованию небислойной гексагональной фазы. СФМ, напротив, предохраняет бислой от такого индуцируемого холестерином разрушения [186].

Показатель трансмембранной асимметрии плазматических мембран является важной величиной, определяющей структурную организацию мембраны и, следовательно, функциональную способность клетки. Изменения трансмембранной асимметрии напрямую связаны с нарушениями в липидном обмене в целом и с нарушением распределения липидов в мембране в частности. Асимметрия бислоя плазматических мембран осуществляется и поддерживается с помощью трансбислойной (флип-флоп) диффузии [20]. Повышение микровязкости мембраны лимфоцитов, связанное с накоплением в ней холестерина, отрицательным образом сказывается на этом процессе. Полученные нами данные о нарушении трансмембранной асимметрии в плазматических мембранах лимфоцитов больных первой и второй групп, проявляющиеся, в уменьшении соотношении мФЭА/оФЭА подтверждают ранее выдвинутое предположение о снижении функциональных способностей лимфоцитов крови при опийной наркомании, так как не вызывает сомнения наличия у больных наркоманиями, прежде всего опийной группы, признаков вторичного иммунодефицита, повышающего риск возникновения у них инфекционных заболеваний и новообразований. В основе этого лежат изменения клеточного иммунитета, и, прежде всего функциональная недостаточность лимфоцитов [51].

В результате обнаруженных и описанных нарушений мембрана клеток становится ригидной, изменяется ее текучесть, селективная проницаемость. Изменяется содержание и соотношение основных катионов в клетке. Нарушается активность ферментов, фиксированных на мембране, снижается способность мембраны блокировать на самых ранних этапах перекисное окисление липидов.

Наращение интенсивности перекисного окисления липидов сопровождается инактивацией большинства ферментов, фиксированных на биомембранах, а высокая ригидность мембран блокирует эффекты «флип-флоп». Следствием является снижение чувствительности мембран к действию физиологических и фармакологических регуляторов [150].

Выявленные изменения липидного состава мембран лимфоцитов крови являются одним из основных факторов, снижающих функциональную активность лимфоцитов. Это может стать причиной формирования иммунодефицита и, как следствие, присоединения инфекционных заболеваний.

Положительное влияние β - АБ обзидана на липидный спектр плазматических мембран лимфоцитов больных третьей группы вероятно можно объяснить его стабилизирующим действием на плазматические мембраны лимфоцитов. Последние несколько лет изучалось стабилизирующее действие различных β - АБ, в том числе обзидана на лизосомальные мембраны кардиомиоцитов [133, 168, 192]. В этих работах было показано, что при добавлении обзидана к гомогенатам миокарда наблюдали мембранстабилизирующее действие на лизосомы в условиях вызывающих лабильзацию лизосомальных мембран [182]. При изучении влияния эмоционально-болевого стресса на активность Na, K-АТФазы в миокарде было выявлено, что введение обзидана перед стрессорным воздействием полностью предотвращает снижение активности данного фермента [133].

Таким образом, применение β - адреноблокатора в комплексе со стандартной терапией при лечении абстинентного синдрома у больных опийной наркоманией уменьшает дестабилизацию липидного слоя плазматических мембран лимфоцитов.

3.2. Изучение активности сфингомиелиназы, содержания сфингомиелина и керамидов в плазматических мембранах лимфоцитов больных опишной наркоманией в состоянии абстиненции до проведения лечения, находившихся на стандартном лечении и лечении, проводимом в комплексе с β -адреноблокатором

Данные об изменении активности сфингомиелиназы ПМ лимфоцитов больных опишной наркоманией в состоянии абстиненции до проведения лечения, на стандартном лечении и лечении проводимом в комплексе с β - АБ представлены в таблице 12 и на рис. 8.

Проведенный анализ показал, что в ПМ лимфоцитов крови у практически здоровых лиц активность сфингомиелиназы составила $4,2 \pm 0,3$ мМР/мин. мг белка. В группе больных опишной наркоманией до лечения обнаружено значительное увеличение активности сфингомиелиназы, её активность возросла в 2,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, у больных, находившихся на стандартном лечении, обнаружено увеличение активности сфингомиелиназы в 2,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой здоровых доноров. В группе больных на комплексном лечении обнаружено менее значительное увеличение активности сфингомиелиназы, её активность возросла в 1,7 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой.

Было выявлено достоверное различие в активности сфингомиелиназы в ПМ лимфоцитов у больных опишной наркоманией группы 2 и группы 3.

Активность сфингомиелиназы (мМР/мин мг белка) в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) ($X \pm m$)

Наименование показателя	Группа контроля n=25	Группа 1 n=75	Группа 2 n=41	Группа 3 n= 34
Активность сфингомиелиназы	4,2 ± 0,3	10,4 ± 0,7*	9,9 ± 0,3*	7,1 ± 0,3*°

Примечание: n – количество обследованных. * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$); ° - достоверное изменение между группой 2 и группой 3 ($p < 0.05$)

В таблице 13 и на рис. 8 представлено изменение содержания церамидов и сфингомиелина в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), находившихся на стандартном лечении (группа 2), и лечении, проводимом в комплексе с β -АБ (группа 3).

В группе 1 и в группе 2 отмечается увеличение содержания сфингомиелина в ПМ лимфоцитов в 1,2 раза ($p < 0,05$). Содержание церамидов снижено в 3,2 раза ($p < 0,05$) и в 2,8 раза ($p < 0,05$) соответственно. В группе больных на комплексном лечении содержание СФМ и церамидов достоверно не отличалось от аналогичных показателей группы контроля.

Было выявлено достоверное различие в содержании СФМ и церамидов в ПМ лимфоцитов у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Содержание сфингомиелина и церамидов (мМР/мг белка) в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) ($X \pm m$)

Наименование показателя	Группа контроля n=25	Группа 1 n=75	Группа 2 n=41	Группа 3 n=34
Сфингомиелин	27,5 ± 1,8	31,1 ± 1,4*	32,1 ± 0,6*	24,0 ± 1,2°
Церамиды	13,1 ± 0,5	4,1 ± 0,6*	4,70 ± 0,27*	11,4 ± 0,3°

Примечание: n – количество обследованных. * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$); ° - достоверное изменение между группой 2 и группой 3 ($p < 0.05$)

В последние годы пристальное внимание исследователей привлекают продукты обмена сфинголипидов, которые являются вторичными мессенджерами и участвуют в процессах регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток [4, 26, 41, 65, 66, 85, 169, 226, 227, 250].

Многообразие и неоднозначность функций сфингомиелина и других продуктов сфингомиелинового цикла (церамиды, сфингозин, сфинганин, сфингезин-1-фосфат), прямо или косвенно связанных с активацией генетического аппарата клетки и передачей внутриклеточных сигналов, привело к необходимости изучения основного фермента метаболизма сфингомиелина – сфингомиелиназы.

Сфингомиелиназа является одним из ключевых ферментов в цепи превращений холинсодержащих фосфолипидов клетки, являющихся не только структурными элементами клеточных мембран [15, 20, 118, 203], но и вторичными мессенджерами [26, 65, 66]. В результате активации метаболизма сфингомиелина включается как позитивный, так и негативный

механизмы регуляции протеинкиназы C. Это определяется тем, что в результате включения синтеза сфингомиелина из церамида и фосфорилхолина образуется диацилглицерин – активатор протеинкиназы C, а гидролиз сфингомиелина сфингомиелиназой приводит к появлению в конечном итоге сфингозина, который обладает множественными функциями, как зависящими от протеинкиназы C, так и независимыми от этого фермента. Сфингозин в определенных концентрациях, вызывающих цитотоксический эффект, способен ингибировать активность протеинкиназы C и те процессы, которые зависят от этого фермента [42].

В наших исследованиях изучалась активность нейтральной сфингомиелиназы, мембраносвязанного и Mg^{++} , Mn^{++} зависимого фермента. Эту изоформу сфингомиелиназы содержат плазматическая и ядерная мембрана [22]. Известно, что именно нейтральная Mg^{2+} , Mn^{2+} - зависимая сфингомиелиназа воздействует на особый “сигнальный” трансдукционный пул сфингомиелина [169, 213, 219, 242], включенный в процессы регулирования жизненной программы клетки (избирательная активность генетического аппарата клетки, пролиферация и дифференцировка, апоптоз) [212, 241].

В наших исследованиях мы выявили достоверное значительное увеличение активности сфингомиелиназы в первой и второй группе больных. В третьей группе больных обнаружено менее значительное увеличение активности сфингомиелиназы (рис 8).

Данные изменения в активности сфингомиелиназы можно объяснить тем, что одним из факторов, определяющих изменение активности сфингомиелиназы, является концентрация субстрата катализируемой реакции – сфингомиелина. С другой стороны, при увеличении активности фермента концентрация субстрата должна снижаться. Уровень сфингомиелина – это динамическая величина, которая определяется скоростью его синтеза *de novo* и скоростью его деградации под действием сфингомиелиназы. Сфингомиелин в клетке может синтезироваться двумя

путями: 1) при взаимодействии церамида с цитидиндифосфат–холином (CDP-холин); 2) при взаимодействии церамида с фосфатидилхолином и переносом холина на сфингомиелин [118].

Таким образом, концентрация сфингомиелина может оставаться повышенной при увеличенной активности сфингомиелиназы, если синтез сфингомиелина *de novo* преобладает над его деградацией под действием фермента. Как уже было показано выше, содержание сфингомиелина в плазматических мембранах лимфоцитов больных первой и второй группы в 1,2 раза превышает аналогичный показатель в контрольной группе (табл. 9). К факторам, косвенно свидетельствующим о преобладании синтеза сфингомиелина над его гидролизом, относятся снижение уровня церамидов (рис 8) являющимися субстратами для синтеза сфингомиелина *de novo*.

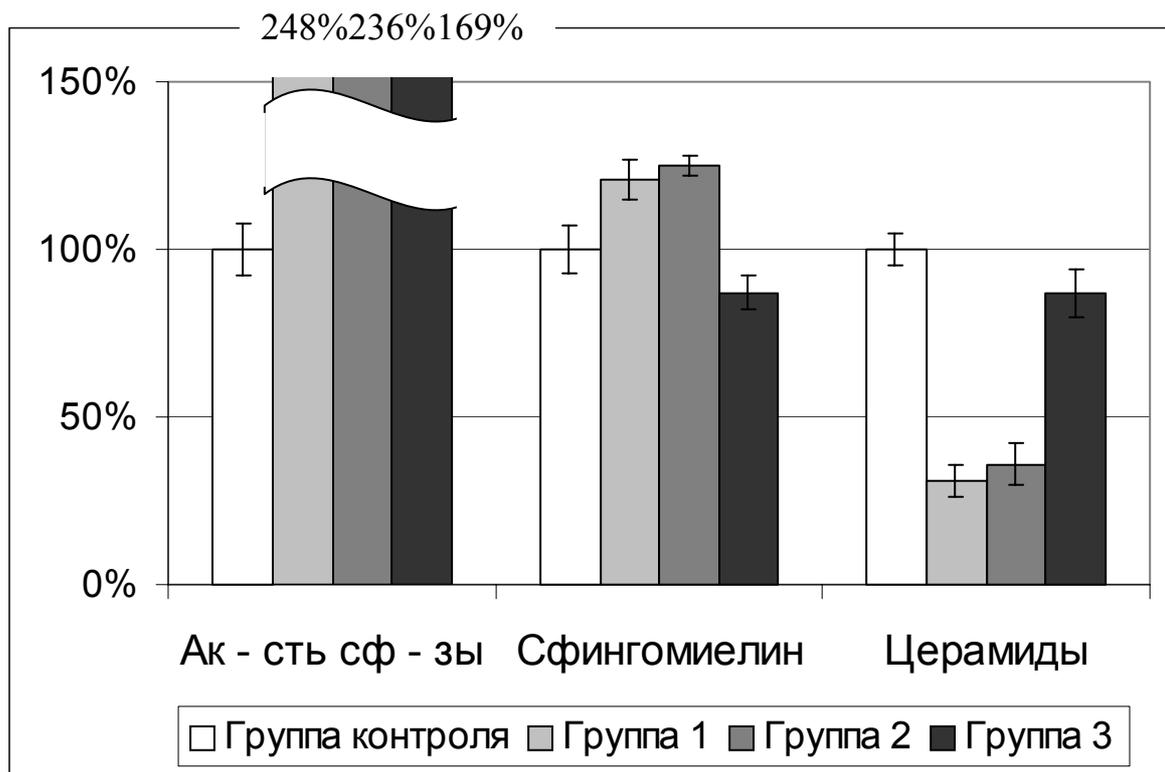


Рис. 8. Активность сфингомиелиназы, содержание сфингомиелина и церамидов в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) (в % к контролю)

В нашем исследовании уровень керамидов и сфингомиелина изменяется разнонаправлено. Такой характер изменений уровней данных липидов можно объяснить либо ускоренным синтезом сфингомиелина из керамидов, либо выраженным процессом последующей деградации керамида под действием керамидазы с образованием сфингенина, сфинганина и сфингозин-1-фосфата (из сфингенина под действием сфингозин - киназы).

Сфингомиелин и керамиды обладают разнонаправленным влиянием на различные клеточные процессы, а в регуляции митогенной активности, пролиферации, дифференцировки клеток и апоптозе даже являются антагонистами. Церамиды непосредственно изменяют транскрипционную активность ДНК [69] вызывают ингибирование протеинкиназы С [195] и экспрессии *bcl-2* [132]. Также керамиды вызывают выход кальция [230] и активацию нуклеаз, снижают активность фосфолипазы D [223] и модулируют активность других фосфолипаз [242] и др.

Данные эффекты лежат в основе антипролиферативного, противоопухолевого и других влияний керамидов [65, 66, 129, 222].

В отличие от керамида сфингомиелин обладает противоположным эффектом на перечисленные внутриклеточные процессы. Таким образом, выявленное повышение содержания сфингомиелина может приводить к активации фосфолипазы D, протеинкиназы С, ингибированию нуклеаз.

В отличие от больных первой и второй группы, у больных, находившихся на стандартной терапии в комплексе с β -АБ, не обнаружено нарушений в содержании сфингомиелина и керамидов.

Таким образом, у больных опийной наркоманией в период абстиненции до начала лечения и, находившихся на стандартном лечении, наблюдается увеличение содержания сфингомиелина, снижение содержания керамидов и повышение активности сфингомиелиназы. Все это приводит к “активному” дисбалансу в липидном обмене лимфоцитов. Все эти изменения могут способствовать появлению лимфоцитов с измененным поверхностным фенотипом, что приводит к нарушению иммунологического гомеостаза,

выражающегося в нарушении клеточного звена иммунитета. Это является одним из основных факторов, снижающих функциональную активность лимфоцитов, обуславливающих формирование иммунодефицита и, как следствие, присоединение инфекционных заболеваний [150].

3.3. Изучение активности фосфолипаз и процессов перекисного окисления липидов плазматических мембран лимфоцитов и сыворотки крови больных опишной наркоманией в состоянии абстиненции до проведения лечения, находившихся на стандартном лечении и лечении, проводимом в комплексе с β - адреноблокатором

Исследование активности фосфолипаз в органах и тканях человека представляет интерес с позиций изучения их физиологической роли, а также с точки зрения выяснения патогенетического значения этих ферментов при различных заболеваниях [159, 198]. Фосфолипазы являются инструментом, регулирующим быстрое изменение состава фосфолипидов, они являются одними из первых ферментов, которые активируются в результате стимуляции клеточной пролиферации [169].

Известно, что фосфолипазы типа А играют важную роль в формировании уникального набора жирных кислот фосфолипидов мембран. ФЛ А₂ является мишенью в клетках действия целого ряда гормонов [8]. Большая часть биологических эффектов, развивающихся при этом, связана с высвобождением полиненасыщенных жирных кислот из фосфолипидов, которые в свою очередь являются предшественниками разнообразной группы физиологически активных метаболитов – простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов [8]. В том числе активация фосфолипаз может влиять на состав и количество жирных кислот, которые входят в состав биоэфекторных молекул сфинголипидов [9, 10, 26, 100, 165, 234].

Таким образом, активация указанных процессов может влиять на активность этих эффекторных молекул, тем самым, изменяя функциональную активность сфингомиелинового цикла. К тому же продукты действия фосфолипаз оказывают прямое действие на ключевой фермент сфингомиелинового цикла – сфингомиелиназу [242] (рис 9).



Рис.9. Активации сигнальных фосфолипаз и ферментов сфингомиелинового цикла, индуцированных связыванием ФНО-α с рецепторами ФНО-α. Примечание: АК – арахидоновая кислота, ФК – фосфатидная кислота, ФЛ – фосфолипиды, Лизо Фл – лизофосфатидилхолин [242].

В нашей работе мы определили активность фосфолипазы A₂ (ФЛ A₂) и фосфолипазы D (ФЛ D).

Данные об изменении их активности в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до начала лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и лечении в комплексе с β-АБ (группа 3) представлены в таблице 14.

Проведенный анализ показал, что в плазматических мембранах лимфоцитов крови у практически здоровых лиц активность ФЛ A₂ составила $1,08 \pm 0,06$ мМР/мин. мг белка. В группе 1 (до начала лечения) обнаружено значительное увеличение активности ФЛ A₂, её активность возросла в 2,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем группы контроля. В группе больных опийной наркоманией, находившихся на стандартном лечении, обнаружено также значительное увеличение активности ФЛ A₂, её активность возросла в 1,8 раза ($p < 0,05$). В группе больных, находившихся на комплексном лечении, обнаружено менее значительное увеличение активности ФЛ A₂ в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем группы здоровых доноров.

Аналогичные изменения мы обнаружили и при исследовании активности ФЛ D. В контрольной группе активность ФЛ D составила $2,1 \pm 0,1$ мМР/мин. мг белка. В первой группе больных происходило увеличение активности ФЛ D в 4, 6 раза ($p < 0,05$), во второй в 3,8 раза ($p < 0,05$), в третьей группе увеличение активности ФЛ D составило в 3, 1 раза ($p < 0,05$), по сравнению с аналогичным показателем группы здоровых доноров.

Было выявлено достоверное различие в активности ФЛ A₂ и ФЛ D в ПМ лимфоцитов у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

В настоящее время можно выделить три протекающих в нормальных условиях процесса, чрезмерная активация которых под влиянием различных условий может вызвать повреждение мембран клеток: 1) действие фосфолипаз и липаз, 2) перекисное окисление липидов, 3) встраивание в липидный бислой экзогенных жирных кислот и лизофосфатидов; в

совокупности они образуют липидную триаду. Действие липидной триады приводит к глубоким сдвигам в липидном окружении мембраносвязанных клеточных белков, а именно ферментов, рецепторов и каналов ионной проницаемости [133].

Таблица 14

Активность фосфолипазы A₂, фосфолипазы D (мМР/мин. мг белка) в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) (X ± m)

Наименование показателя	Группа контроля n=25	Группа 1 n=75	Группа 2 n=41	Группа 3 n= 34
Активность фосфолипазы A ₂	1,08 ± 0,06	2,4 ± 0,1*	1,98 ± 0,12*	1,50 ± 0,07*°
Активность фосфолипазы D	2,1 ± 0,1	9,7 ± 0,7*	8,0 ± 0,4*	6,60 ± 0,12*°

Примечание: n – количество обследованных. * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$); ° - достоверное изменение между группой 2 и группой 3 ($p < 0.05$)

Роль активации фосфолипаз в повреждении липидного бислоя определяется тем, что в соответствии с общим механизмом действия фосфолипаз они разрушают фосфолипиды бислоя мембран, то есть отрицательный эффект чрезмерной активации фосфолипаз, может реализоваться за счет двух факторов – потери мембранами фосфолипидов и за счет образования лизофосфатидов, которые в свою очередь повреждают мембраны. Обработка элементов саркоплазматического ретикулула ФЛ A₂

увеличивает проницаемость мембран для Ca^{2+} и одновременно уменьшает поглощение Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулом без нарушения использования АТФ в Са-насосе. При продолжающемся действии ФЛ A_2 прогрессирующая потеря мембраной жирных кислот влечет за собой значительное угнетение АТФазы Са-насоса [133].

Активация фосфолипаз при опийной наркомании в состоянии абстиненции может реализоваться тремя путями.

Во-первых, катехоламины, выход которых в кровь возрастает при абстинентном синдроме [82, 209], активируют систему кинин-каллекреина и вызывают ряд явлений:

фактор Хагемана → кининоген → брадикинин → активация фосфолипазы А.

Во-вторых, увеличение концентрации Ca^{2+} в саркоплазме, обусловленное АТФ-дефицитным торможением Са-насоса, активизирует вхождение фосфолипаз в липидный бислой, где они приобретают специфическую активность.

В-третьих, активация ПОЛ может вызвать лабильзацию лизосом и способствовать высвобождению большей части популяции фосфолипаз [133].

Одной из причин, приводящих к активации фосфолипаз, является повреждение клеточных мембран гипоксическими или иммунными факторами. При этом важную роль играет предшествующее воздействие на мембраны клеток протеолитических ферментов – трипсина, проназы, нейраминидазы, что в присутствии экзогенных фосфолипаз вызывает полное разрушение холинсодержащих фосфолипидов [198].

Также активация ФЛ A_2 возможна под действием различных бактерий – их эндотоксинов и липополисахаридов [236], что имеет существенное значение при развитии инфекционных осложнений в течение опийной наркомании. Известно, что ФЛ A_2 является мишенью для ряда гормонов, в том числе для тиреоидных гормонов. Было выяснено, что тироксин

подавляет активность ФЛ A_2 в клетках печени и снижает скорость продукции простагландина E_2 . Не исключено, что тиреоидные гормоны, подобно стероидным, усиливают в клетках синтез белка-ингибитора фосфолипаз А [8]. Поэтому при развитии гипотиреоза происходит резкая активация ФЛ A_2 . Известно, что употребление опиатов приводит к значительному понижению концентрации в крови тиреоидных гормонов [209], это может приводить к активации ФЛ A_2 плазматических мембран лимфоцитов больных опийной наркоманией.

Причиной увеличения активности фосфолипаз может служить действие ФНО- α , основного цитокина, который вырабатывается при воспалении и обладает эффектом активации фосфолипаз. При связывании ФНО- α с рецептором ФНО- α происходит активация не только сфингомиелиназы [70], но и активация фосфолипаз A_2 , С и D [179]. Активация фосфолипаз является существенным моментом в проявлении цитотоксического действия ФНО- α . Ингибиторы фосфолипаз защищают клетки от цитотоксического действия ФНО- α , в то время как активаторы увеличивают его цитотоксическое действие и выход арахидоновой кислоты [42].

Активирующее влияние на ФЛ A_2 оказывают некоторые биогенные амины — гистамин, норадреналин, 5-ОН-триптамин, дофамин, ацетилхолин, а также γ -аминомасляная, глутаминовая и аспарагиновая кислоты [22]. Эти же субстанции, кроме аминокислот, стимулируют также ацилирование фосфолипидов в присутствии фосфата и фторидов. Повышение активности фосфолипазы A_2 приводит к удалению токсичных перекисленных жирнокислотных остатков фосфолипидов из тканей. Подавлять активность фосфолипазы A_2 могут продукты гидролиза фосфолипидов или их аналоги, в частности линолевая и арахидоновая кислоты, ацетилхолин, тиохолин, прокаин, диглицериды, фосфатидная кислота, р-глицерофосфат и др [22].

Активная ФЛ A_2 участвует в повреждении ткани следующими путями:

1. Аутолиз клеточных мембран, когда гидролиз их фосфолипидов доминирует над процессами обновления. В процессе гидролиза фосфолипидов освобождаются цитотоксические жирные кислоты. Кроме того, ФЛ A_2 вызывает уменьшение электрического сопротивления и разрыв бислоев липидов мембран, за тем следует глубокое нарушение внутриклеточного метаболизма [120, 159]. При проведении корреляционного анализа была выявлена обратная зависимость между активностью ФЛ A_2 и отношением мФЭА/оФЭА в плазматических мембранах лимфоцитов у больных группы 1 ($r = - 0,51$, $p < 0,05$). Также была выявлена обратная зависимость между активностью ФЛ D и отношением мФЭА/оФЭА в плазматических мембранах лимфоцитов у больных группы 1 и группы 2 ($r = - 0,47$, $p < 0,05$; $r = - 0,46$, $p < 0,05$) соответственно. Это доказывает, что увеличение активности фосфолипаз в плазматических мембранах лимфоцитов приводит к нарушению липидного спектра, так как изменения трансмембранной асимметрии напрямую связаны с нарушениями в липидном обмене в целом и с нарушением распределения липидов в мембране в частности.

2. Продуктом гидролиза фосфолипидов ФЛ A_2 являются лизофосфолипиды – чрезвычайно цитотоксичные вещества [120].

Мы определили содержание ЛФЛ в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до проведения лечения, при проведении стандартного лечения и лечения, проводимого в комплексе с β -АБ (табл 15). Было выявлено, что в группе больных опийной наркоманией до начала лечения содержание ЛФЛ в ПМ лимфоцитов увеличивается в 19 раз ($p < 0,05$) по сравнению с группой здоровых доноров. В группе больных, находившихся на стандартном лечении, увеличение содержания ЛФЛ составило в 15 раз ($p < 0,05$), и в 7 раз ($p < 0,05$) в группе больных на комплексном лечении по сравнению с аналогичным показателем группы контроля.

ЛФЛ, помимо действия фосфолипазы A_2 , может образовываться ещё и под действием лецитин–холестерин–ацетилтрансферазы при переносе жирнокислотного остатка с фосфатидилхолина на холестерин и благодаря окислительным процессам при активации собственной фосфолипазой A_2 - активности апо–В–апобелка. Проведение корреляционного анализа между активностью ФЛ A_2 и содержанием ЛФЛ не выявило достоверной связи между данными параметрами ($p > 0,05$). Это доказывает, что увеличение фракции ЛФЛ происходит не только из-за активации ФЛ A_2 , но и за счет активации других метаболических путей, которые приводят к синтезу и накоплению ЛФЛ.

Роль избытка лизофосфатидов в повреждении мембран определяется тем, что они являются амфифилами и обладают двухфазным действием на мембраны. Их включение в липидный бислои меняет липидное окружение, а как следствие и активность ферментов, рецепторов и каналов ионной проводимости. Механизм повреждающих эффектов лизофосфатидов, по-видимому, связан с их способностью, разрывать структуру биологических мембран. Лизофосфатиды не только повреждают мембрану сарколеммы и саркоплазматического ретикулума, создавая, таким образом, предпосылку для накопления в клетке Ca^{2+} , но и могут нарушать функционирование митохондрий и системы гликолиза [133]. При проведении корреляционного анализа была выявлена обратная зависимость между содержанием ЛФЛ и отношением мФЭА/оФЭА в плазматических мембранах лимфоцитов у больных группы 1 и группы 2 ($r = - 0,32$, $p < 0,05$ и $r = - 0,43$, $p < 0,05$) соответственно. Это доказывает, что увеличение содержания ЛФЛ в плазматических мембранах лимфоцитов приводит к нарушению липидного спектра.

Содержание лизофосфолипидов (мМР/мг белка) в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) ($X \pm m$)

Наименование показателя	Группа контроля n=25	Группа 1 n=75	Группа 2 n=41	Группа 3 n=34
Лизофосфолипиды	1,5 ± 0,1	28,8 ± 2,6*	22,5 ± 3,2*	10,5 ± 0,9*°

Примечание: n – количество обследованных. * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$); ° - достоверное изменение между группой 2 и группой 3 ($p < 0.05$)

В последнее время появилось множество данных о регуляторной функции лизофосфатидилхолина (лизолецитина) [26, 53]. Было обнаружено, что при низких концентрациях лизофосфатидилхолин стимулирует активность протеинкиназы C, усиливает клеточную пролиферацию, стимулирует дифференцировку лимфоидных клеток и т.д [69, 217]. Также лизофосфатидилхолин выполняет определенную роль в клеточной передаче информации (рис 10).

В отличие от фосфоинозитольного цикла, ЛФЛ обладает как положительным, так и отрицательным влиянием на активность протеинкиназы C. Его эффект зависит от концентрации: в физиологических концентрациях он обладает максимумом действия, а в повышенных – действует как эндогенный детергент со способностью повреждать клетки [53]. В нормальных концентрациях ЛФЛ оказывает влияние на иммунные

клетки, а именно хемотаксический эффект на моноциты, вызывает активацию Т – лимфоцитов и индукцию митогенного эффекта у макрофагов [129, 164].

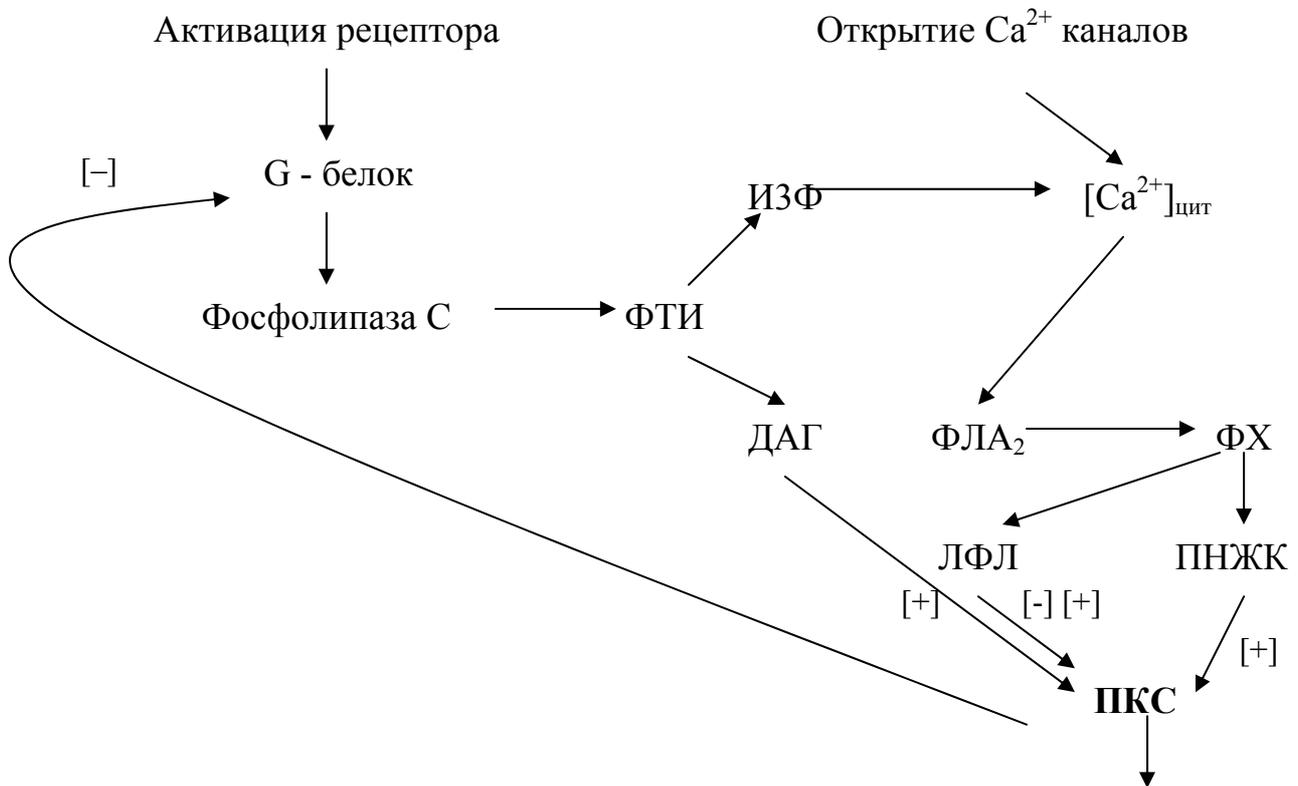


Рис. 10. Вероятная роль лизофосфолипида в протеинкиназ-С - зависимой клеточной регуляции.

Примечание: ФТИ – фосфатидилинозитол, И₃Ф – инозитол 3 фосфат, ДАГ – диацилглицерол, ФЛА₂ – фосфолипаза А₂, ФХ – фосфатидилхолин, ЛФЛ - лизофосфалипид, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты, ПКС – протеинкиназа С, [Ca²⁺]_{цит} - внутриклеточный кальций, [+] – положительный эффект, [-] – отрицательный эффект.

В нашем исследовании мы обнаружили более высокое содержание ЛФЛ в ПМ лимфоцитов больных опийной наркоманией до начала лечения и на стандартном лечении, что может свидетельствовать во – первых, о нарушении иммунологического звена в патогенезе опийных наркоманий, и,

во – вторых, о большем повреждение клетки вследствие прямого цитолитического действия ЛФЛ на лимфоциты.

3. Под влиянием ФЛ A_2 при гидролизе ФЛ клеточных мембран высвобождается арахидоновая кислота (АК) [28, 159]. Под действием циклооксигеназы образуются простагландины, простаглицлин и тромбоксан [174].

АК обладает ингибирующим влиянием на ФЛА $_2$ и оказывает стимулирующее действие на сфингомиелиназу [22]. Однако, в наших исследованиях мы обнаружили повышенную активность ФЛА $_2$. Это может быть связано с усилением процессов перекисного окисления липидов, приводящего к уменьшению количества длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот, одной из которых является арахидоновая, и происходит увеличение моноеновых ЖК. В отсутствие арахидоновой кислоты как основного ингибитора фосфолипазы A_2 , активность её остаётся повышенной.

4. Активная ФЛ A_2 тесно взаимодействует с перекисным окислением липидов (ПОЛ). Это обусловлено тем, что продукты ПОЛ активируют ФЛ A_2 . Активация ФЛ A_2 является мощным усилителем влияния ПОЛ на биологические мембраны [159]. Этот эффект усиления считают главной причиной деструкции мембран при различных заболеваниях.

При проведении корреляционного анализа была выявлена прямая зависимость между содержанием ТБК – активных продуктов в ПМ лимфоцитов и активностью ФЛ A_2 у больных группы 1 (до проведения лечения) и группы 2 (при использовании стандартной схемы лечения) ($r=0,79$, $p<0,05$ и $r=0,53$, $p<0,05$) соответственно. Это подтверждает утверждение, что продукты ПОЛ активируют ФЛ A_2 .

Также обнаруженное нами увеличение активности фосфолипазы D может служить причиной повышенной активности сфингомиелиназы, так как продукт действия фосфолипазы D – фосфатидная кислота является активатором сфингомиелиназы [22].

В группе больных, находившихся на комплексном лечении с β -АБ, выявлено достоверно меньшее увеличение активности ФЛ A_2 и ФЛ D по сравнению с группой больных, находившихся на стандартном лечении. Это может быть обусловлено стабилизирующим действием обзидана на лизосомальные мембраны, что препятствует выходу фосфолипаз из лизосом.

В ходе обсуждения результатов при объяснении причин возникновения изменений активности ФЛ A_2 упоминался процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ). В нашей работе мы определили количество конечных продуктов ПОЛ: ТБК – активных продуктов (ТБК – ап), а так же активность ферментов антиоксидантной защиты: каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в ПМ лимфоцитов и сыворотке крови больных опиоидной наркоманией в состоянии абстиненции до начала лечения (группа 1), находившихся на стандартном лечении (группа 2) и лечении, проводимом в комплексе с β -АБ (группа 3). Результаты представлены в таблице 16,17 и 18 и на рис 11 и 12.

В группе практически здоровых доноров содержание ТБК – активных продуктов в плазматических мембранах лимфоцитов составило $2,96 \pm 0,16$ мкмоль/мг белка, в сыворотке данный показатель составил $6,0 \pm 0,3$ мкмоль/г белка. В группе больных до лечения содержание ТБК – активных продуктов в плазматических мембранах лимфоцитов превышало аналогичный показатель в группе контроля в 9,1 раз ($p < 0,05$), в сыворотке увеличение составило в 1,9 раза ($p < 0,05$). В группе больных, находившихся на стандартном лечении содержание ТБК – активных продуктов в плазматических мембранах лимфоцитов превышало аналогичный показатель в группе здоровых доноров в 7,3 раза ($p < 0,05$), в сыворотке увеличение составило в 1,4 раза ($p < 0,05$). В группе больных, находившихся на комплексном лечении, было выявлено увеличение содержания ТБК – активных продуктов в плазматических мембранах лимфоцитов в 3,1 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля, в сыворотке изменение содержания ТБК – активных продуктов было недостоверно. Было выявлено достоверное различие в содержании ТБК – активных продуктов в ПМ

лимфоцитов и сыворотке у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

При исследовании активности антиоксидантных ферментов обнаружено, что в группе контроля активность каталазы в плазматических мембранах лимфоцитов составила $5,30 \pm 0,26$ мкат/мг белка, в сыворотке $16,50 \pm 0,23$ мкат/л соответственно. В группе больных опийной наркоманией до начала лечения активность каталазы в ПМ лимфоцитов была ниже аналогичного показателя в группе здоровых доноров в 1,96 раза ($p < 0,05$), в сыворотке снижение составило в 2,4 раза ($p < 0,05$). В группе больных, находившихся на стандартном лечении, активность каталазы в лимфоцитах была ниже аналогичного показателя в группе контроля в 1,4 раза ($p < 0,05$), в сыворотке снижение составило в 1,8 раза ($p < 0,05$). В группе больных, находившихся на комплексном лечении, изменение активности каталазы в ПМ лимфоцитов и сыворотке по сравнению с группой контроля было недостоверно. Было выявлено достоверное различие в активности каталазы в ПМ лимфоцитов и сыворотке у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Активность СОД так же претерпевала аналогичные изменения. В группе практически здоровых доноров активность СОД в лимфоцитах составила $13,9 \pm 0,3$ усл.ед/мг белка, в сыворотке данный показатель составил $1,6 \pm 0,1$ усл.ед/л.

В группе больных опийной наркоманией до начала лечения было выявлено снижение активности СОД в лимфоцитах в 2,9 раза ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем группы контроля, в сыворотке снижение составило в 2,7 раза ($p < 0,05$). В группе больных, находившихся на стандартном лечении, было выявлено снижение активности СОД в ПМ лимфоцитов в 2,4 раза ($p < 0,05$), в сыворотке снижение составило в 1,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем группы практически здоровых доноров. В группе больных, находившихся на комплексном лечении, изменение активности СОД в лимфоцитах и сыворотке было недостоверно по сравнению с группой контроля. Было выявлено достоверное

различие в активности СОД в ПМ лимфоцитов у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Таким образом, в результате проведенных исследований у больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции были выявлены существенные отличия от здоровых доноров в протекании реакций перекисного окисления в ПМ лимфоцитов и сыворотке крови. Изменения выражаются в увеличении активности процессов ПОЛ и снижении активности антиоксидантных ферментов. Наиболее выраженные изменения наблюдаются в ПМ лимфоцитов периферической крови больных опийной наркоманией, особенно это проявляется у группы больных до проводимого лечения и у больных, находившихся на стандартном лечении. В группе больных, находившихся на комплексном лечении, изменения активности ПОЛ менее выражены, а активность антиоксидантных ферментов достоверно не изменяется.

Содержание продуктов перекисного окисления липидов: ТБК – активных продуктов в плазматических мембранах лимфоцитов и сыворотке больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) ($X \pm m$)

	Лимфоциты	Сыворотка
Наименование показателя	ТБК-ап, (мкмоль/мг.белка)	ТБК-ап, (мкмоль/г.белка)
Группа контроля n=25	2,96 ± 0,16	6,00 ± 0,30
Группа 1 n=75	27,00 ± 1,90*	11,10 ± 0,70*
Группа 2 n=41	21,60 ± 0,90*	8,10 ± 0,24*
Группа 3 n= 34	9,10 ± 0,60*°	7,10 ± 0,28°

Примечание: n – количество обследованных. * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$); ° - достоверное изменение между группой 2 и группой 3 ($p < 0.05$); ТБК – ап - ТБК – активные продукты

Активность каталазы в плазматических мембранах лимфоцитов и сыворотке больных опишной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) ($X \pm m$)

	Лимфоциты	Сыворотка
Наименование показателя	Каталаза,(мкат/мгбелка)	Каталаза, мкат/л
Группа контроля n=25	5,30 ± 0,26	16,50 ± 0,23
Группа 1 n=75	2,70 ± 0,20*	6,90 ± 0,50*
Группа 2 n=41	3,80 ± 0,30*	9,20 ± 0,50*
Группа 3 n= 34	5,00 ± 0,30°	17,50 ± 0,60°

Примечание: n – количество обследованных. * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$); ° - достоверное изменение между группой 2 и группой 3 ($p < 0.05$)

В организме человека процессы ПОЛ имеют большое значение для обновления липидов мембран клеток - посредством этого – обеспечивается поддержания структурного гомеостаза. Интенсивность ПОЛ имеет двухстороннюю взаимосвязь со структурой мембраны: с одной стороны, скорость окислительных свободно-радикальных процессов зависит от уровня доступности липидов мембраны и их ненасыщенности, с другой – ПОЛ изменяет состав фосфолипидов мембраны, липид-липидные, липид-белковые взаимодействия, а следовательно, ее ригидность, структуру [140].

Таблица 18

Активность супероксиддисмутазы в плазматических мембранах лимфоцитов и сыворотке больных опишной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) ($X \pm m$)

	Лимфоциты	Сыворотка
Наименование показателя	СОД, (усл.ед/мг белка)	СОД, (усл.ед/л)
Группа контроля n=25	13,90 ± 0,30	1,60 ± 0,10
Группа 1 n=75	4,80 ± 0,20*	0,60 ± 0,10*
Группа 2 n=41	5,90 ± 0,40*	0,90 ± 0,10*
Группа 3 n= 34	12,30 ± 0,80°	1,36 ± 0,13°

Примечание: n – количество обследованных. * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$); ° - достоверное изменение между группой 2 и группой 3 ($p < 0.05$)

Известно, что степень выраженности процессов перекисного окисления липидов определяется соотношением функциональной активности прооксидантных и антиоксидантных метаболических механизмов [21, 205]. Исходя из этого, интенсификация ПОЛ может быть обусловлена увеличением активности прооксидантных систем, антиоксидантной недостаточностью и сочетанием этих двух факторов.

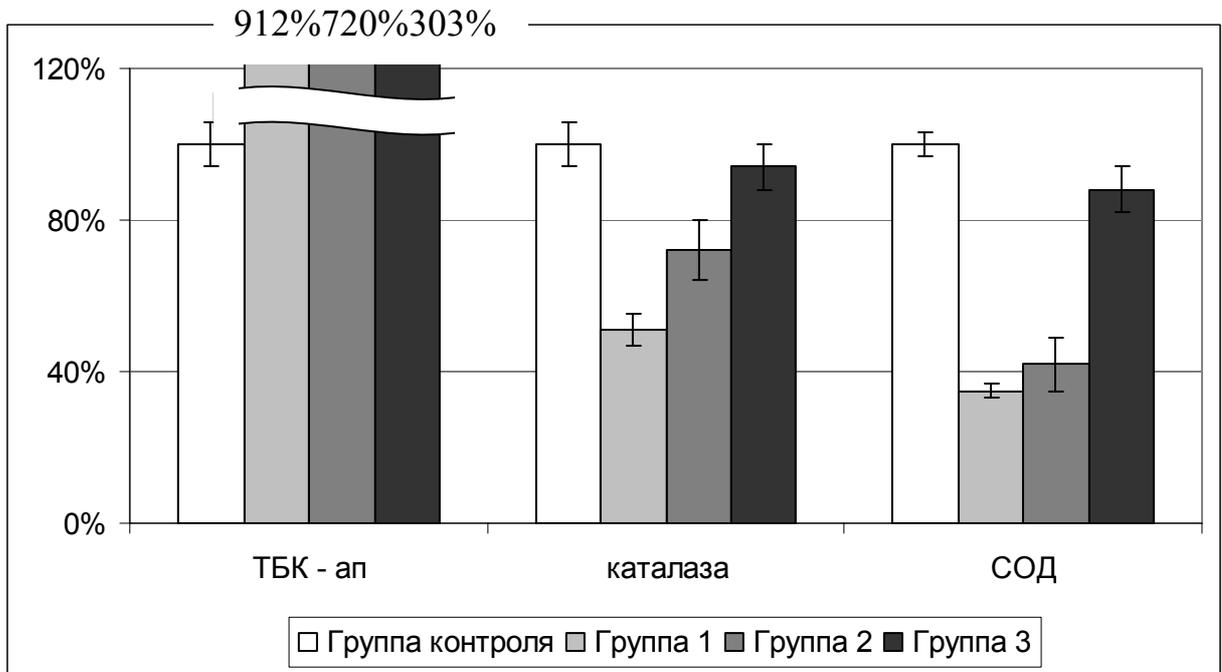


Рис. 11. Содержание ТБК – активных продуктов, активность каталазы и супероксиддисмутаза в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) (в % к контролю)

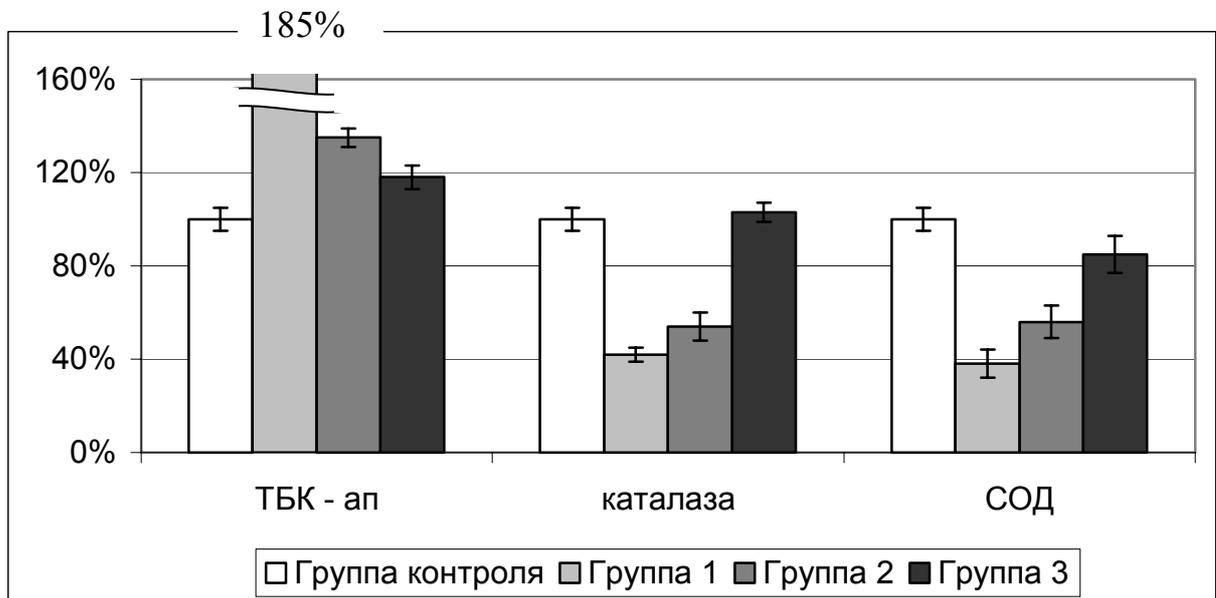


Рис. 12. Содержание ТБК – активных продуктов, активность каталазы и супероксиддисмутаза в сыворотке больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) (в % к контролю)

К прооксидантным системам относятся ксантинооксидаза, прооксидантные системы нуклеиновых кислот и микросомальная гидроксиглирующая система [205].

Поэтому разные по своим свойствам антиоксидантные системы необходимы для сохранения активности процессов ПОЛ на стационарном уровне в условиях значительных изменений активности образования радикалов. Недостаток поступления облигатных антиоксидантов приводит к развитию свободно-радикальных патологий [45, 78]. Действие внешних прооксидантов, в том числе химических веществ, и активация эндогенных механизмов генерации АФК приводит к напряжению механизмов антиоксидантной защиты и развитию окислительного стресса, который может проявляться на клеточном, тканевом и организменном уровне. Возникновение окислительного стресса – важный патогенетический фактор развития воспалительных процессов [78, 134].

Избыточная активация ПОЛ, в настоящее время рассматривается как один из основных механизмов в патогенезе различных заболеваний, в том числе, таких как ревматоидный артрит, рак, токсичность некоторых лекарственных препаратов.

Существует гипотеза, согласно которой процессы ПОЛ в клетке поддерживаются на стационарном уровне с помощью системы, организованной по принципу отрицательной обратной связи по замкнутому кругу и обрывающей цепи окисления [26]. Активация ПОЛ в лимфоцитах может в известной мере обуславливать снижение АОА липидов (вследствие снижения ненасыщенности жирных кислот в составе фосфолипидов) в свою очередь, снижение АОА липидов не исключает возможности инициации ПОЛ, что представляется важным, так как характер метаболизма лимфоцитов определяет иммунологическую реактивность организма. Предполагается, что процессы ПОЛ, изменяя структуру и фосфолипидный состав мембран клеток, могут влиять на процессы клеточного ответа иммунокомпетентных клеток. Активация ПОЛ ведет и к искажению информации от внеклеточных

регуляторов к внутриклеточным эффекторным системам, а следствием этого может быть нарушение адаптационных способностей клетки [75, 191].

Изменение физико-химических свойств плазматических мембран клеток при снижении насыщенности ацильных остатков их ФЛ приводит к снижению жидкостности мембран, изменению конформации и функциональной активности рецепторов, ферментных и сигнальных систем (Na^+ , K^+ -АТФазы, 5- нуклеотидазы) [194].

Предполагается, что продукты ПОЛ опосредуют токсическое действие различных химических соединений, попадающих в организм извне [210]. Известно, что на определенных этапах метаболизма реакции свободнорадикального окисления липидов могут выступать в качестве факторов, лимитирующих адаптивные возможности клетки и способствующих развитию в организме комплекса неспецифических изменений [73].

Полученные результаты позволяют утверждать, что в условиях абстинентного синдрома при опиоидной наркомании разбалансированность процессов оксидации - антиоксидации и активация ПОЛ наблюдается как в лимфоцитах, так и в сыворотке крови. Однако, первично и наиболее выражено, ПОЛ инициируется на клеточном уровне в мембранах лимфоцитов. Увеличение продуктов ПОЛ в мембранах лимфоцитов предполагает их существенный выброс в кровотока (вследствие деструкции мембран лизофосфолипидами) [115, 178]. Действительно, окисленные формы липидов, являясь более полярными, легко выходят из мембран [17]. Не исключено также, что увеличение продуктов ПОЛ в крови при опиоидной наркомании связано не только с возможностью их спонтанного окисления в процессе циркуляции в кровяном русле, но и с повышением секреции изначально окисленных липопротеинов печенью вследствие снижения активности антиоксидантных ферментов [115].

Усиление процессов ПОЛ при опиоидной наркомании, возможно, происходит в результате активации прооксидантных систем. Так как в

процессе приготовления кустарно изготовленных наркотических препаратов дополнительно привносятся вещества (органические растворители, ангидриды), обладающие собственным токсическим действием. В результате метаболизма этих соединений на цитохроме P₄₅₀ системы микросомального окисления происходит генерация АФК потенциально опасных для окружающих клеток и тканей, что может приводить к активации ПОЛ [197, 205].

С другой стороны известно, что воздействие наркотиков приводит к интенсивному выбросу нейромедиаторов группы катехоламинов из депо.

Схема на рис.13 показывает два пути, за счет которых избыток катехоламинов и активация их биосинтеза при опийной наркомании в состоянии абстинентного синдрома могут активировать ПОЛ [133, 220].

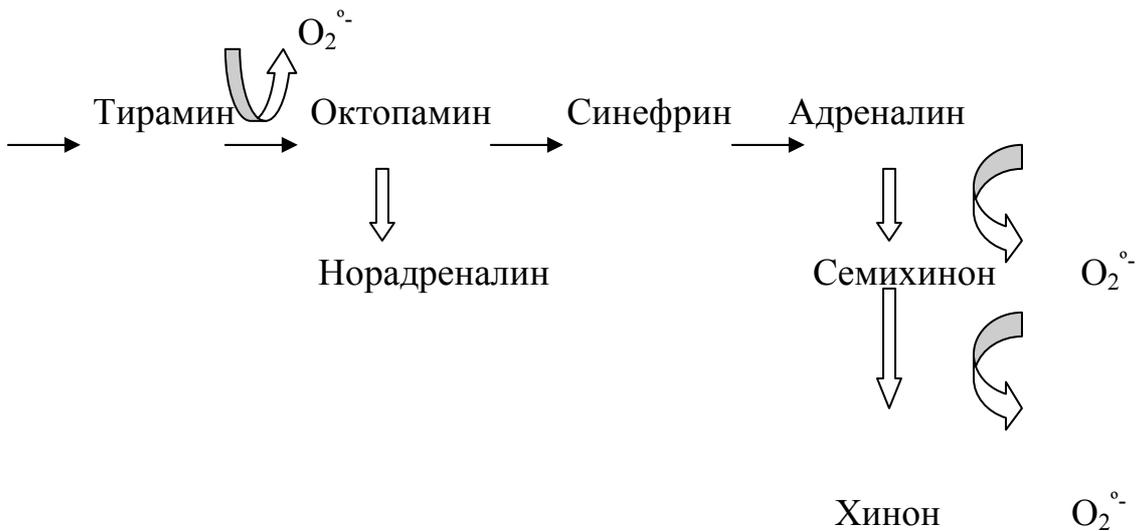


Рис. 13. Схема активации перекисного окисления липидов в процессе синтеза и распада катехоламинов [133].

Во-первых, активные формы кислорода закономерно образуются на определенных этапах биосинтеза катехоламинов; во-вторых, при окислении адреналина в адренохром возникает семихинон адреналина, который может

сбрасывать электрон на кислород и таким образом генерировать супероксидрадикал – важный индуктор ПОЛ [133].

Длительная активация процессов ПОЛ приводит к истощению антиоксидантных систем организма.

Выделяют две фазы в изменении активности ферментов антирадикальной защиты. В начале заболевания наблюдается компенсаторное увеличение активности ферментов, затем происходит их истощение, что связано с нарушением структурно - функциональной целостности мембран и метаболических процессов в клетке [62]. Одним из критериев напряжения в системе «активные кислородные метаболиты-антиоксиданты» является выраженное увеличение активности СОД [135]. Повышение активности СОД рассматривается как фактор, играющий основную роль в устойчивости организма к супероксидному анион-радикалу [23]. Так как повышение активности СОД приводит к увеличению содержания перекиси водорода, в этих условиях возрастает роль каталазы, разлагающей H_2O_2 . Высокая активность СОД и каталазы свидетельствует о значительном потенциале и сопряженности дисмутазной и каталазной реакций, но в условиях напряженной деятельности этих ферментов сохраняется потенциальная опасность, что резервная мощность антиоксидантной системы окажется недостаточной для полной компенсации усилившегося ПОЛ, и соотношение «АКМ - АО» изменится в пользу прооксидантных факторов.

Уменьшение активности каталазы и СОД может происходить из-за длительного действия активных форм кислорода на клетку и, как следствие, истощения данных ферментов. Снижение антиокислительной активности может быть связано с уменьшением содержания природных антиоксидантов (токоферол, ретинол, убихинон, аскорбиновая кислота, глутатион, серосодержащие аминокислоты), с уменьшением поступления антиоксидантов с пищей в связи с нарушением их всасывания в ЖКТ [111, 205]. В ряде исследований, было показано, что острое и хроническое

введение морфина вызывает истощение антирадикальной защиты плазмы, следствием чего может быть повреждение эндотелия сосудов [158]. При проведении корреляционного анализа была выявлена обратная зависимость между активностью СОД и содержанием ЛФЛ в плазматических мембранах лимфоцитов в группе 1 (до проведения лечения) и в группе 2 (при использовании стандартной схемы лечения) ($r = -0,50$, $p < 0,05$ и $r = -0,49$, $p < 0,05$) соответственно. Это подтверждает утверждение, что снижение активности СОД лимфоцитов в результате активации процессов ПОЛ происходит активация ФЛ A_2 с образованием ЛФЛ накопление которого, ведет к дестабилизации бислоя плазматических мембран.

Комплексная оценка процессов ПОЛ и сопряженной с ними антиокислительной системы позволяет заключить, что в этиопатогенезе абстинентного синдрома при опиоидной наркомании играет важную роль развитие так называемого окислительного стресса, характерной особенностью которого является относительное преобладание звена, характеризующего активность свободнорадикальных процессов [137]. Для разных фаз и стадий заболевания, как правило, характерно определенное состояние системы «прооксидации - антиоксидации», или специфическая разновидность окислительного стресса, поэтому для более точной диагностики, прогнозирования развития и поиска адекватной терапии, необходима именно комплексная оценка окислительных процессов и систем их детоксикации, а не анализ отдельных звеньев [138].

В группе больных, находившихся на стандартном лечении в комплексе с β -АБ, изменения активности ПОЛ менее выражены, а активность антиоксидантных ферментов достоверно не изменяется по сравнению с группой сравнения. Это может быть обусловлено тем, что обзидан предотвращает активацию ПОЛ действуя по механизму, принципиально отличающемуся от механизма действия антиоксидантов, т. е. скорее всего ингибированием аденилатциклазной системы или уменьшением вхождения Ca^{2+} в клетки [133]. Ингибирование ПОЛ приводит к снижению активности

фосфолипазы A₂ и фосфолипазы D [133], которое мы наблюдали в группе больных находившихся на комплексном лечении.

Таким образом, в ПМ лимфоцитов и сыворотке крови больных опийной наркоманией отмечались определенные изменения показателей перекисного окисления липидов. Наблюдаемое нами увеличение содержания ТБК – активных продуктов свидетельствовало об увеличении в лимфоцитах крови больных количества липопероксидов, которые нарушают клеточный гомеостаз, что, может привести к нарушению функций лимфоцитов, сопровождающихся появлением «запрещённых» клонов клеток, увеличением выработки провоспалительных цитокинов, уменьшением срока жизни клеток и т.д.

Возникающая при этом дестабилизация бислоя плазматической мембраны вследствие накопления лизофракций, свободных жирных кислот и фосфатидной кислоты, вызывает физическое разделение мембранного цитоскелета и плазмалеммы с последующим отшнуровыванием мембранных везикул, что в настоящее время рассматривается как признак необратимого старения клетки [206].

Кроме того, нельзя исключить и цитотоксический эффект гидроперекисей, ненасыщенных альдегидов, малонового диальдегида [75, 113] на эндотелиоциты и иммунокомпетентные клетки. Известно, что при опийной наркомании имеет место иммунодефицит по Т-клеточному типу [155].

В целом, следует отметить, что в ПМ лимфоцитов крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции, наблюдались ощутимые изменения процессов ПОЛ, метаболиты которого обладают мембранотоксическими свойствами. Учитывая важность липидного состава в поддержании структурно-функциональной стабильности лимфоцитов, можно предположить, что выявленная нами дезорганизация липидного состава лимфоцитарных мембран должна являться одной из причин потери лимфоцитами их функциональных свойств.

3.4. Изучение протеиназно-ингибиторной системы плазмы крови больных опишной наркоманией в состоянии абстиненции до проведения лечения, находившихся на стандартном лечении и лечении, проводимом в комплексе с β -адреноблокатором

Особое значение в процессе адаптации и защиты организма, а также при определенных условиях в патогенезе различных заболеваний принадлежит протеолитическим системам тканей и плазмы крови [212]. Протеолитические ферменты принимают участие в регуляции состояния биологических мембран.

Уровень протеолитической активности существенно влияет на состояние клеточного метаболизма и потребление клетками кислорода. Незначительное повышение протеолитической активности усиливает способность клеток продуцировать ингибиторы, в то время как высокая протеолитическая активность нарушает течение обменных процессов, значительно снижает потребление кислорода и уровень антириптической активности клеток. Угнетающее действие высокой протеолитической активности устраняется введением в клеточную среду ингибиторов протеиназ [182]. Протеолитические ферменты участвуют в регуляции биологических процессов на разных уровнях. Они контролируют концентрацию белковых и пептидных биорегуляторов на молекулярном уровне, включены в реализацию многих клеточных функций (биогенез структур, фагоцитоз, деление и т. д.) и тем самым играют важную роль в физиологии клетки. Первостепенная роль принадлежит протеолитическим ферментам в осуществлении ряда физиологических процессов, реализуемых определенными системами белков или отдельными тканями. В таких процессах, как свертывание крови, активация системы комплемента и т. д., протеолиз служит не только для запуска, но и для реализации всего процесса [121]. При воспалении и аллергических реакциях лизосомальные протеазы и протеолитические

факторы комплемента запускают систему внутреннего каскада свертывания крови [74].

Анализ морфофункциональных, ультраструктурных и метаболических нарушений клеток при патологии показывает, что, несмотря на различные этиологические факторы, в клетках внутренних органов человека и животных наблюдаются в разной мере выраженные нарушения структурных образований цитоплазмы, митохондрий, лизосом, рибосом, аппарата Гольджи и ядра. Возникающие структурные поломки сопровождаются глубокими функционально-метаболическими изменениями [167]. При гипоксии усиливаются процессы ПОЛ, что приводит к повреждению мембран. Активируются выделяющиеся из лизосом гидролазы, и следующее за этим увеличение протеолитической активности приводит к аутолизу, гибели клеток. Нарушение рецепторного аппарата клетки сопровождается патологическими клеточными реакциями, выключением контролирующих внутриклеточный гомеостаз механизмов. При первых признаках поражения структурной целостности изменяются электрический потенциал и осмотический градиент клеток. Ферменты клеточной оболочки – такие, как протеиназы, АТФазы служат регуляторами реактивных сдвигов в плазматических мембранах клетки [131, 216]. В связи с этим понятна роль внутриклеточных ингибиторов протеиназ: в обычных условиях они обеспечивают контроль за процессами ограниченного протеолиза, а при гипоксии снижают избыточную активность протеиназ. В основе деструктивных процессов, развивающихся после действия патологических факторов, лежит активация аутолиза, обусловленная избыточным содержанием лизосомальных ферментов в цитоплазме клетки.

В нашей работе мы изучали активность трипсина и содержание плазминогена. Данные об изменении их активности и содержания в плазме крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции на стандартном лечении и в комплексе с β -АБ представлены в таблице 19 и на рис.14.

Проведенный анализ показал, что в плазме крови у практически здоровых лиц активность трипсина составила $3,8 \pm 0,2$ МЕ/мл. В группе больных опийной наркоманией до лечения обнаружено значительное увеличение активности трипсина в 3,1 раза ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем группы здоровых доноров. В группе больных опийной наркоманией на стандартном лечении также выявлено значительное увеличение активности трипсина в 2,3 раза ($p < 0,05$). В группе больных на комплексном лечении обнаружено менее значительное увеличение активности трипсина в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем группы контроля. Было выявлено достоверное различие в активности трипсина у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Содержание плазминогена в плазме крови у практически здоровых доноров составило $118,2 \pm 3,5$ %. В группе больных опийной наркоманией до начала лечения (группа 1) и на стандартном лечении (группа 2) обнаружено снижение содержания плазминогена в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем группы контроля. В группе больных на комплексном лечении (группа 3) содержание плазминогена также было снижено в 1,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой здоровых доноров. Было выявлено достоверное различие в содержании плазминогена у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Таблица 19

Активность трипсина и содержание плазминогена в плазме крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) ($X \pm m$)

Наименование показателя	Группа контроля n=25	Группа 1 n=75	Группа 2 n=41	Группа 3 n= 34
Трипсин (МЕ/мл)	3,8 ± 0,2	11,8 ± 0,8*	8,7 ± 0,5*	5,40 ± 0,15*°
Плазминоген (%)	118,2 ± 3,5	92,6 ± 2,7*	94,2 ± 2,4*	102,2 ± 5,6*°

Примечание: n – количество обследованных. * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$); ° - достоверное изменение между группой 2 и группой 3 ($p < 0.05$)

Трипсин является общим активатором протеолитических систем крови. Установлено, что трипсин участвует в образовании кининов, активирует плазминоген, увеличивает концентрацию фибриногена. Известны эффекты трипсина на биологические мембраны: повышение проницаемости, изменение электропроводности и поверхностного заряда, трипсин активирует аденилатциклазу, высвобождение альдостерона, увеличивает транспорт глюкозы по типу инсулина [34]. Предшествующее воздействие на мембраны клеток протеолитических ферментов – трипсина, проназы и других приводит к активации фосфолипаз, что вызывает полное разрушение холинсодержащих фосфолипидов [198]. При проведении корреляционного анализа была выявлена прямая зависимость между активностью трипсина сыворотки крови и активностью фосфолипазы D плазматических мембран

лимфоцитов у больных опийной наркоманией группы 1 ($r=0,41$, $p<0,05$). Это доказывает, что увеличение активности протеолитических ферментов в сыворотке крови может приводить к активации фосфолипаз и последующему повреждению биологических мембран.

Имеются данные о способности трипсина воздействовать на ферменты обмена нуклеиновых кислот и белка.

Трипсин изменяет активность РНК- полимеразы, гликогенсинтетазы. Установлено, что трипсин способен индуцировать клеточную пролиферацию (синтез ДНК, фосфорилирование гистонов, метилирование ДНК). Принимает участие в ответе Т и В лимфоцитов на митогенный стимул [121].

В норме трипсин в плазме крови существует в неактивном состоянии из-за образования комплекса с ингибиторами. Увеличение активности трипсина в плазме может быть патогенетическим фактором развития таких патологических состояний как язвенная болезнь, панкреатит, инфаркт миокарда, лучевая болезнь, нарушение микроциркуляции и развитие шоковых реакций [121].

Увеличение активности трипсина, запускающего протеиназы кининовой, фибринолитической и свертывающей систем, комплемента, очевидно, имеет решающее значение в развитии необратимых катаболических реакций организма.

Плазминоген – профермент, широко распространенный в организме. Он входит в плазминовое [83] звено фибринолиза, которое кроме плазминогена включает еще эндотелиальный активатор плазминогена, проактиватор плазминогена, киназы: (стрептокиназа, стафилокиназа и др.), ингибиторы плазмина, ингибиторы активаторов плазминогена.

Плазминоген синтезируется в печени, костном мозге, почках. Под действием некоторых активаторов плазминоген превращается в плазмин – сериновую протеиназу, расщепляющую лизил-аргининовые и лизин-лизиновые связи в белковых субстратах, главным образом в фибрине и фибриногене. Синтезирующиеся в клетках эндотелия активаторы

плазминогена высвобождаются из эндотелия под действием многочисленных эндогенных и экзогенных стимулов: ацидоза и гипоксии – при закрытии сосуда тромбом, некоторых vasoактивных медиаторов – гистамина, серотонина, брадикинина. При некоторых стрессовых ситуациях функционирует катехоламиновый путь высвобождения активатора плазминогена. Как уже упоминалось выше, в период абстинентного синдрома при опийной наркомании имеет место ускоренный синтез катехоламинов [5, 215], что может приводить к высвобождению из эндотелия активатора плазминогена. Также плазминоген может активироваться под действием лизосомальных протеаз лейкоцитов и тромбина. При инфицировании тромбов в этом принимает участие бактериальные протеазы, например стрептокиназа, являющаяся для микробов фактором противодействия барьерной роли тромбов [74]. Следовательно, снижение концентрации плазминогена у больных опийной наркоманией может означать не только активацию системы фибринолиза, но и гиперактивацию в кровотоке других протеолитических систем.

Степень активации плазмина, как правило, отражает или интенсивность внутрисосудистого свертывания и защитную реакцию организма на угрозу образования тромбов (вторичный фибринолиз), или самостоятельное включение плазминовой системы ее активаторами в патологический процесс (первичный фибринолиз) [83].

К протеолитическим ферментам относится и тромбин – сериновая протеиназа семейства трипсина – ключевой фермент свертывающей системы крови, который превращает фибриноген в фибрин, участвует в регуляции многих физиологических и патофизиологических процессов, таких как свертывание крови и противосвертывающие механизмы, тромбообразовании и фибринолиз, регуляция сосудистого тонуса и процессов развития организма, а также в процессах воспаления (вазоконстриктор, хемоаттрактант и активатор лейкоцитов) [74], репарации тканей, атерогенеза, канцерогенеза, болезни Альцгеймера [189].

Показателем наличия активного тромбина в плазме является наличие растворимых фибринмономерных комплексов (РФМК). Тромбин образуется из протромбина под действием фактора X (фактор Стюарта – Прауэр) свертывающей системы крови, который относится к центральному фактору протромбиназы, активируемый трипсином. Факт обнаружения РФМК имеет диагностическое значение, так как они являются маркерами тромбинемии и внутрисосудистого свертывания крови, и их наличие свидетельствует об активации свертывания вплоть до появления активного тромбина в крови и о развитии гиперкоагуляции или ДВС-синдрома [83]. ДВС-синдром возникает под влиянием различных факторов: эндогенных (катехоламины, тромбин и т. д.) и экзогенных (микробы, вирусы, сосудистые протеазы и т. д.). При срыве процесса (локализации гемостаза) непрерывно или периодически диссеминированно внутри микро- и макрососудов образуются тромбы. В результате поражаются паренхиматозные органы, в которых развиваются тромбозы [83].

В нашей работе мы определили содержание РФМК. Данные об их содержании в плазме крови больных опишной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения, на стандартном лечении и лечении в комплексе с β -АБ представлены в таблице 20.

Проведенный анализ показал, что в плазме крови у практически здоровых лиц содержание РФМК составило $3,8 \pm 0,3$ мг/100 мл. В группе больных опишной наркоманией до начала лечения (группа 1) и в группе больных опишной наркоманией, находившихся на стандартном лечении (группа 2), обнаружено значительное увеличение содержания РФМК в 2,9 раза ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем группы контроля. В группе больных на комплексном лечении (группа 3) обнаружено менее значительное увеличение содержания РФМК в 2,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой здоровых доноров, но при этом не было достоверных отличий от содержания РФМК в группе больных, находившихся на стандартной схеме лечения.

Содержание растворимых фибринмономерных комплексов в плазме крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) ($X \pm m$)

Наименование показателя	Группа контроля n=25	Группа 1 n=75	Группа 2 n=41	Группа 3 n= 34
РФМК (мг/100 мл)	3,8 ± 0,3	11,2 ± 0,7*	10,9 ± 0,8*	9,0 ± 0,9*

Примечание: n – количество обследованных. * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$); РФМК - растворимые фибринмономерные комплексы.

Таким образом, обнаружение в плазме крови больных опийной наркоманией повышенного содержания РФМК свидетельствует о наличии в плазме активного тромбина, который приводит к активации свертывающей системы крови и активации плазминогена.

Известно, что между системами иммунитета и свертывающей системой крови существуют тесные связи [105, 106]. В сосудистом русле всегда находятся аутоантитела к активированным факторам свертывания крови [104, 204]. В работах [37] было установлено, что при активации свертывания крови уменьшается содержание клеток CD 8+, CD 16+ и увеличивается CD 22+, а при активации фибринолиза в крови резко снижаются клетки, несущие детерминанты CD 8+, CD 16+ и CD 22+, но увеличивается фракция зрелых Т-лимфоцитов (CD 3+) и хелперно-индуцирующих клеток (CD 4+). Значительные сдвиги наблюдаются со стороны отдельных классов иммуноглобулинов. При активации свертывания крови слегка повышается

содержание Ig G, Ig A резко увеличивались, а Ig M резко снижались. При активации фибринолиза резко повышались Ig G, Ig A и резко снижались Ig M. При активации свертывания крови в сыворотке резко увеличивается концентрация ФНО α ., который в свою очередь может приводить к активации ключевого фермента сфингомиелинового цикла – сфингомиелиназы и фосфолипаз A₂ и D. В процессе гемокоагуляции, благодаря ограниченному протеолизу, обнажаются антигенные детерминанты активированных факторов свертывания [36, 37]. Это, в свою очередь, приводит к стимуляции антигенпрезентирующих клеток, что неминуемо должно отразиться как на клеточном составе лимфоцитов, так и образовании отдельных классов иммуноглобулинов [37].

При активации протеолиза большое значение имеет состояние ингибиторного звена плазмы крови. Контроль каскадных протеолитических систем осуществляется благодаря мощной системе ингибиторов, которые полностью или частично лишают ферменты каталитической активности.

Протекторный эффект действия ингибиторов протеиназ на клеточном уровне при патологии проявляется прежде всего в уменьшении степени дегрануляции и разрушения клеток, в предупреждении лавинообразного поступления протеолитических ферментов из лизосом в цитоплазму, а затем и за пределы клетки в ткани и кровеносное русло [131, 167, 196]. Ингибиторы протеолитических ферментов, находящиеся в цитоплазме клеток, встраиваются в мембраны клеточных органоидов и оказывают свое регулирующее действие на скорость течения процессов ограниченного протеолиза и внутриклеточный белковый синтез, влияя тем самым на процесс клеточного метаболизма, функциональную активность клеток и их устойчивость к действию патологических факторов [167]. Полагают, что ингибиторы, встраиваясь в мембрану лизосом, модифицируют ее структуру и функцию, в результате чего изменяется текучесть и проницаемость мембран и прекращается выход в цитоплазму лизосомальных ферментов. Видимо, эти изменения и обеспечивают мембранопротекторные эффекты действия

ингибиторов типа контрикала. Действие ингибиторов трипсина и калликреина может также проявляться опосредованно, через инактивацию калликреин-кининовой системы [167].

В нашей работе мы определяли активность таких ингибиторов протеолитических ферментов как α_1 – протеиназный ингибитор (α_1 –ПИ), α_2 – макроглобулин (α_2 –МГ), антитромбин – III (АТIII). Данные об их активности в плазме крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения, находившихся на стандартном лечении и лечении в комплексе с β -АБ, представлены в таблице 21 и на рис.14.

Проведенный анализ показал, что в плазме крови у практически здоровых доноров активность α_1 – ПИ составила $30,1 \pm 1,3$ ИЕ/мл. В группе больных опийной наркоманией до проведения лечения (группа 1) было выявлено снижение активности α_1 – ПИ в 1,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля. В группе больных опийной наркоманией на стандартном лечении (группа 2) обнаружено снижение активности α_1 – ПИ в 1,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем группы здоровых доноров. В группе больных на комплексном лечении (группа 3) активность α_1 – ПИ достоверно не отличалась от аналогичного показателя в группе здоровых доноров. Было выявлено достоверное различие в активности α_1 – ПИ у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Активность α_2 – МГ в плазме крови практически здоровых доноров составила $4,41 \pm 0,12$ ИЕ/мл, что превышало аналогичный показатель в группе больных опийной наркоманией до проведения лечения (группа 1) в 2,9 раза ($p < 0,05$), и в 2,2 раза ($p < 0,05$) у больных, находившихся на стандартном лечении (группа 2). Активность α_2 – МГ в плазме крови больных, находившихся на комплексном лечении (группа 3), достоверно не отличалось от аналогичного показателя в группе здоровых доноров. Было выявлено достоверное различие в активности α_2 – МГ у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Активность АТ III в плазме крови контрольной группы составила $110,4 \pm 1,0$ %. В группе больных опийной наркоманией до проведения лечения (группа 1) и, находившихся на стандартном лечении (группа 2), этот показатель был снижен в 1,8 раза ($p < 0,05$). Снижение в группе больных, находившихся на комплексном лечении (группа 3), составило в 1,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой практически здоровых доноров и достоверно отличалось от аналогичного показателя в группе 2.

Таблица 21

Активность α_1 – протеиназный ингибитора, α_2 – макроглобулина и антитромбина – III в плазме крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) ($X \pm m$)

Наименование показателя	Группа контроля n=25	Группа 1 n=75	Группа 2 n=41	Группа 23 n= 34
α_1 – Протеиназный ингибитор (ИЕ/мл)	$30,1 \pm 1,3$	$17,1 \pm 0,7^*$	$20,1 \pm 0,8^*$	$34,6 \pm 1,8^\circ$
α_2 – Макроглобулин (ИЕ/мл)	$4,41 \pm 0,12$	$1,5 \pm 0,1^*$	$2,00 \pm 0,16^*$	$4,70 \pm 0,19^\circ$
Антитромбин – III (%)	$110,4 \pm 1,0$	$59,7 \pm 2,0^*$	$60,6 \pm 0,8^*$	$90,7 \pm 1,4^\circ$

Примечание: n – количество обследованных. * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$); $^\circ$ - достоверное изменение между группой 2 и группой 3 ($p < 0.05$)

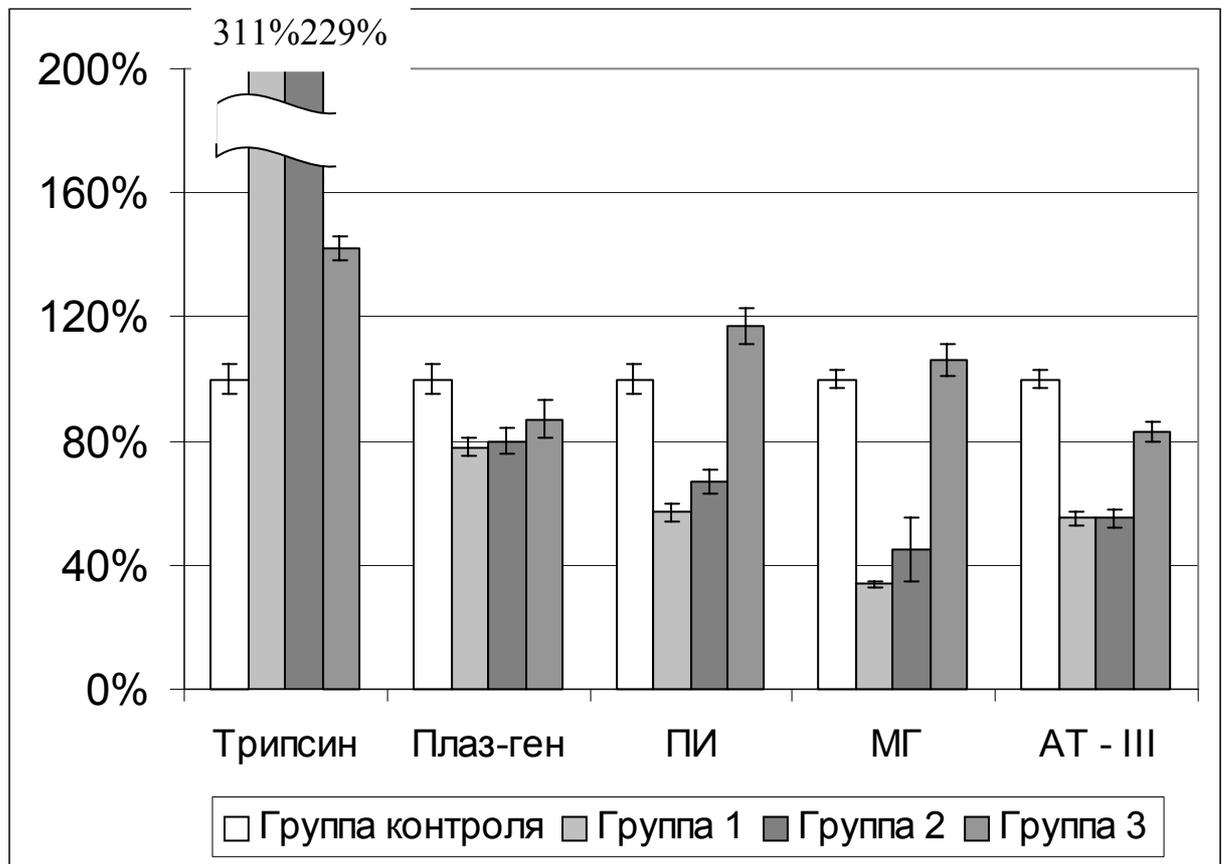


Рис.14. Активность трипсина, α_1 –протеиназного ингибитора, α_2 – макроглобулина, антитромбина-III, содержание плазминогена в сыворотке и плазме крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) (в % к контролю)

АТ III относят к ингибиторам тромбина, также он является слабым ингибитором плазмина; α_1 – ПИ, снижает активность тромбина, трипсина и плазмина; α_2 – МГ слабый ингибитор тромбина, плазмина, калликреина и трипсина. АТ-III синтезируется главным образом, в эндотелии и клетках печени. Выполняет роль основного плазменного кофактора гепарина, под влиянием которого трансформируется из прогрессивного антикоагулянта в ингибитор немедленного действия. 1 мг АТ-III в присутствии гепарина можно ингибировать генерацию 750 ед. тромбина, а без гепарина – 1 ед. тромбина. При врожденном или приобретенном снижении активности АТ-III развиваются тромбозы и тромбоэмболии. Известно, что норадреналин

быстро и резко снижает содержание АТ-III в крови. Так как частично АТ III синтезируется в эндотелии, то повреждение эндотелия при длительном воспалении может привести к нарушению синтеза АТ III. Одним из маркеров повреждения эндотелия является повышение активности фактора Виллебранда в плазме крови.

Фактор Виллебранда (ФВ) (VIII – vWF) – сульфатированный гликопротеид, накапливающийся в эндотелии в виде так называемых телец Вейбеля-Пелледа. При повреждении сосуда или активации эндотелия он выбрасывается в кровь и может использоваться как свидетель, маркирующий эти процессы [74].

В своей работе мы определили активность ФВ в плазме крови. Данные об активности ФВ в плазме крови больных опиоидной наркоманией в состоянии абстиненции до проведения терапии, на стандартном лечении и лечении в комплексе с β -АБ представлены в таблице 22.

Проведенный анализ показал, что в плазме крови у практически здоровых доноров активность ФВ составила $78,7 \pm 3,7$ %. В группе больных до проведения терапии (группа 1) и, находившихся на стандартном лечении (группа 2), этот показатель был достоверно повышен в 1,7 раза ($p < 0,05$) и в 1,6 раза ($p < 0,05$) в группе больных, находившихся на комплексном лечении, по сравнению с аналогичным показателем группы контроля, при этом не было выявлено достоверного отличия между группой 2 и группой 3. При проведении корреляционного анализа была выявлена обратная зависимость между активностью ФВ и активностью АТ – III в плазме крови у больных опиоидной наркоманией группы 1 и группы 2 ($r = -0,41$, $p < 0,05$ и $r = -0,52$, $p < 0,05$) соответственно. Это доказывает, что снижение активности АТ – III у больных опиоидной наркоманией происходит в результате нарушения синтеза АТ – III при повреждении эндотелия.

Активность фактора Виллебранда в плазме крови больных опиоидной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и на комплексном лечении (группа 3) ($X \pm m$)

Наименование показателя	Группа контроля n=25	Группа 1 n=75	Группа 2 n=41	Группа 3 n= 34
Фактор Виллебранда (%)	78,7 ± 3,7	136,7 ± 6,8*	132,7 ± 4,0*	128,4 ± 6,6*

Примечание: n – количество обследованных. * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$)

Поврежденный эндотелий не преобразует сигналы кининов, серотонина, дериватов АТФ, тромбоксанов, ацетилхолина, катехоламинов в нитроксидный сосудорасширяющий сигнал, как он это делает в норме, так как его клетками не формируются в достаточном количестве NO и простациклин (P_gI₂). Интактный эндотелий вырабатывает антикоагулянтные и антиагрегантные белки – тромбомодулин и протеин S, которые, вместе с печеночным белком С и α₂ – МГ эндотелиального и макрофагального происхождения, представляют собой функционально взаимосвязанный антитромботический каскад, собираемый и активируемый на поверхности эндотелия [74].

При системном повреждении и активации эндотелия (системные васкулиты, гиперпродукция и системное распространение активирующих эндотелий цитокинов и медиаторов, таких как ФНО и катехоламинов) происходит снижение антитромботической резистентности сосудов, и сосудистая стенка становится тромбогенной. Это может стать причиной

развития ДВС-синдрома. Также к ДВС-синдрому может привести генерализованная активация кининовой системы, комплемента и полианионные молекулы в крови (бактериемия, сепсис, токсинемия с попаданием в кровь липополисахаридов бактерий). В этом случае полианионы провоцируют коагуляцию в системном кровотоке, а липополисахариды еще и активируют лейкоциты, эндотелий и тромбоциты, в результате чего эти клетки выделяют цитокины и факторы свертывания, становятся клейкими и агрегируют. Вполне вероятно, что ДВС-синдром представляет характерное осложнение всех состояний, протекающих с системной циркуляцией медиаторов воспаления [74].

α_2 – Антиплазмин, α_2 –МГ, α_1 – ПИ, АТ- III обладают антиплазминовым свойством. Фибринолитическая система может активироваться до такой степени, что содержание ингибиторов плазмينا может исчерпываться. α_2 – МГ играет важную роль в организме как один из регуляторов активности ферментов, участвующих в свертывании крови, фибринолизе, кининогенезе, иммунных реакциях. Установлено, что α_2 –МГ может связываться с внутренней поверхностью эндотелия. Исходя из изложенного, сделано предположение об участии этого блока в регуляции протеолиза на стенке сосуда. α_2 –МГ имеет также свойство соединяться с мембранами клеток ретикулоэндотелиальной системы (лимфоцитами, макрофагами, лейкоцитами) и ингибировать протеазозависимые реакции иммунных процессов. α_2 –МГ относится к основным ингибиторам калликреинов плазмы, полностью снимает их биологическое действие.

Все известные ингибиторы протеолитических ферментов способны в той или иной мере влиять на ряд иммунологических феноменов. Так, α_1 – ПИ тормозит бласттрансформацию стимулированных фитогемагглютинином лимфоцитов, поскольку он влияет на этапы, которые зависят от проявления активности протеолитических ферментов. α_1 – ПИ контролирует реакцию макрофагов на медиаторы, продуцируемые сенсibilизированными лимфоцитами, и тормозит развитие *in vitro* первичного иммунного ответа

[218]. Так как α_2 –МГ синтезируется также и лимфоидными клетками, поэтому он может влиять на их реакции. α_2 –МГ оказывает ингибирующее действие на активность естественных клеток-киллеров, антителозависимую опосредованную клетками цитотоксичность. α_2 –МГ изменяет реакции лимфоцитов на хемотоксические, митогенные факторы, лимфокины, лектины и чужеродные антигены [64]. Известно, что α_2 –МГ предотвращает избыточный протеолиз, взаимодействуя с факторами, контролирующими стадии иммунного ответа. α_2 –МГ способен связывать фактор роста фибробластов, ИЛ-1. В комплексе с α_2 –МГ ИЛ-1 полностью сохраняет свою биологическую активность. ИЛ-1 выполняет функции посредника в иммунном ответе, потенцирует вызванные брадикинином и ФНО высвобождение простагландина E_2 . На долю α_2 – МГ приходится 3,5% общей антитромбиновой активности.

α_1 – ПИ обеспечивает 90% антитрипсической активности плазмы, ингибирует также химотрипсин, плазмин, тромбин, эластазу, протеолитические ферменты лейкоцитов, бактериальные протеиназы. Он является быстродействующим ингибитором трипсина. α_1 – ПИ поливалентен, он защищает организм от действия эндогенных и экзогенных (бактериальных) протеиназ.

В циркулирующей крови свободного плазмина нет, так как ингибиторы связывают и инактивируют даже его следовые количества. Зато есть плазминоген, способный быстро превращаться в плазмин при появлении соответствующих активаторов. Содержание АТ III, α_2 –МГ снижается при потреблении этих факторов в результате активации процессов свертывания, при этом развиваются тяжелейшие поликомпонентные нарушения системы гемостаза. При появлении в крови активных факторов свертывания, тромбина и растворимого фибрина активируется АТ- III, количество которого быстро падает из-за необходимости нейтрализации протеолитических ферментов [83]. При проведении корреляционного анализа была выявлена прямая зависимость между содержанием плазминогена и

активностью АТ – III в плазме крови у больных опийной наркоманией группы 1 и группы 2 ($r= 0,42$, $p<0,05$ и $r= 0,40$, $p<0,05$) соответственно. Это доказывает, что снижение содержания активности АТ – III у больных опийной наркоманией происходит из-за потребления этого фактора в результате активации свертывания и превращения плазминогена в плазмин.

Таким образом, снижение АТ III и α_2 –МГ в плазме крови больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома обусловлено активацией процессов свертывания, и появления в крови активного тромбина, о чем свидетельствует повышение количества РФМК. Снижение активности α_1 – ПИ может быть в результате действия на фермент пероксидных и супероксидных анионов образующихся в результате активации процессов ПОЛ, превращая активный α_1 – ПИ в неактивную форму. Кроме того, α_1 – ПИ может инактивироваться биологическими окислителями, которые высвобождаются фагоцитирующими нейтрофилами, инфильтрирующими очаги воспаления и модифицирующими ингибитор так, что он не способен связывать эластазу. Протеолитические ферменты, кроме расщепления тканевых структур, могут также усиливать образование окисляющих веществ, вследствие чего α_1 – ПИ значительно инактивируется, то есть ингибиторное звено исключается из механизма контроля за действием образующихся протеиназ [35]. Как уже упоминалось выше, в период абстинентного синдрома при опийной наркомании имеет место активация процессов ПОЛ и снижение активности ферментов антирадикальной защиты (каталазы и СОД), что вероятно и приводит к снижению активности α_1 – ПИ в плазме крови больных опийной наркоманией. При проведении корреляционного анализа была выявлена прямая зависимость между активностью α_1 – ПИ плазмы крови и активностью каталазы сыворотки крови у больных опийной наркоманией группы 1 и группы 2 ($r= 0,52$, $p<0,05$ и $r= 0,36$, $p<0,05$) соответственно. Это доказывает, что снижение активности α_1 – ПИ у больных опийной

наркоманией происходит в результате активации процессов ПОЛ и снижения активности антиоксидантных ферментов.

В группе больных, находившихся на стандартном лечении в комплексе с β -АБ, изменения активности протеолитических ферментов и их ингибиторов по сравнению с группой больных, находившихся на стандартном лечении менее выражены. Так в группе больных на комплексном лечении обнаружено менее значительное увеличение активности трипсина и в меньшей степени было снижено содержание плазминогена и антитромбина III, а активность α_2 – МГ и α_1 – ПИ достоверно не отличалось от аналогичных показателей в группе здоровых доноров.

За последние годы установлено, что β - адренергические препараты влияют на лизосомы, что проявляется в изменении активности лизосомальных ферментов и перераспределении активности между связанной с органеллами и свободной фракциями (по перераспределению можно судить об изменениях стабильности лизосомальных мембран). Примеры стабилизирующего действия β - адренергических средств на лизосомальные мембраны, известные из литературы, относятся в основном к обзидану. Было экспериментально доказано наличие β - адренорецепторов в лизосомах. Фармакологическое выключение β - адренорецепторов является препятствием к появлению характерного для β - адреностимуляции влияния на активность лизосомальных ферментов и стабильность лизосомальных мембран. Зависимость изменений стабильности лизосомальных мембран и ферментативной активности лизосом от функциональной активности β - адренорецепторов открывает принципиальную возможность регулировать с помощью β -адренергических средств лизосомальную систему при патологических состояниях [183, 192].

Комплексообразование β - адренергических средств с β - адренорецепторами (в том числе и на лизосомах) препятствует действию избытка катехоламинов, свойственного абстинентному синдрому при опийной наркомании. Также известно, что β – АБ (при длительном

воздействии) снижают фибринолитическую активность крови и препятствуют ее повышению при физической нагрузке [83].

С другой стороны, как уже было выяснено ранее, в группе больных находившихся на стандартном лечении в комплексе с β -АБ изменения активности ПОЛ менее выражены, а активность антиоксидантных ферментов достоверно не изменяется по сравнению с группой сравнения. В результате, возможно, снимается ингибирующее действие на α_1 – ПИ пероксидных и супероксидных анионов образующихся в результате активации процессов ПОЛ.

Таким образом, при опийной наркомании в состоянии абстинентного синдрома нарушается соотношение между протеиназами и ингибиторами в сторону преобладания протеолиза, что проявляется увеличением активности трипсина, появлением активного тромбина в крови и снижением активности ингибиторов протеиназ, таких как α_1 – ПИ, α_2 – МГ и антитромбин III.

Воздействие трипсина на мембраны клеток приводит к активации фосфолипаз, что вызывает полное разрушение холинсодержащих фосфолипидов, нарушение структуры лизосомальных мембран и выход кислых гидролаз в цитоплазму с последующим развитием цитолитических процессов и повреждением тканей. Снижение активности ингибиторов протеиназ на клеточном уровне при патологии проявляется, прежде всего, в увеличении степени дегрануляции и разрушения клеток, в лавинообразном поступлении протеолитических ферментов из лизосом в цитоплазму, а затем и за пределы клетки в ткани и кровеносное русло. Все это приводит к активации свертывающей системы крови. Параллельно идет активация фибринолиза, о чем свидетельствует снижение плазминогена.

Таким образом, больные опийной наркоманией являются группой риска развития ДВС-синдрома вследствие интенсивного фибринообразования, снижения антикоагулянтной активности, активации фибринолиза. С другой стороны, так как свертывание и фибринолиз тесно связаны с системой иммунитета, то чрезмерная активация данных процессов может приводить к

значительному изменению клеточного состава лимфоцитов, изменению содержания основных классов иммуноглобулинов и увеличению продукции ФНО α . [37]. В свою очередь, ФНО α вызывает увеличение активности фосфолипаз и нарушение липидного бислоя клеточных мембран [22].

Заключение

Использование наркотических средств, полученных путем кустарной химической обработки опия-сырца, оказывающих помимо наркотического действия также и токсическое действие, отражается на особенностях абстинентного синдрома. Все патологические механизмы, запущенные во время наркотической интоксикации имеют место и при абстиненции, тем более что эта интоксикация усугубляется токсическими метаболитами, полученными при обработке макового сырья органическими растворителями, оказывающими токсическое действие на клеточные мембраны [18].

В патогенезе опийной наркомании большое значение имеют изменения иммунологического гомеостаза, выражающиеся в большинстве случаев в нарушении клеточного звена иммунитета [51]. Функциональная активность лимфоцитов зависит от состояния биологических мембран [143].

Биологическим мембранам принадлежит ключевая роль в обеспечении и регуляции физиологической активности клеток [20, 52, 184]. В настоящее время большинство известных заболеваний рассматривают как состояния, сопряженные с поражением клеточных мембран, поскольку дестабилизация молекулярной ультраструктуры мембран при патологических процессах приводит к потере их функциональной компетентности, изменению жизнедеятельности клеток в целом и даже их гибели [39, 52].

В результате проведенных исследований нами были обнаружены изменения в липидном составе мембран лимфоцитов крови у больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома, которые выражались в повышении содержания суммарной фракции ФХ + ФС, фракций СФМ, ЛФЛ и ХС и снижении содержания ФЭА, церамидов и ЭХ. Выявлено нарушение отношений ХС/ФЛ и мФЭА/оФЭА. У больных опийной наркоманией происходит повышение микровязкости мембран лимфоцитов, что связано с увеличением содержания ХС и ростом соотношения ХС/ФЛ. Изменения липидного спектра плазматических

мембран лимфоцитов были более выражены у больных до начала лечения и у пациентов, находившихся на стандартной схеме лечения.

Выявленные изменения липидного состава мембран лимфоцитов крови являются одним из основных факторов, снижающих функциональную активность лимфоцитов. Это может стать причиной формирования иммунодефицита и, как следствие, присоединения инфекционных заболеваний.

В последние два десятилетия в результате многочисленных исследований было установлено, что липиды являются не только формой депонирования метаболического топлива и основной структурной компонентой клеточных мембран [4, 26, 169, 175, 200, 201, 211, 213, 226, 227, 228, 241, 246, 248, 250], но и системой биологических эффекторов, регуляторов и медиаторов, участвующих практически во всех физиологических процессах клетки [41, 65, 66, 224].

Особый интерес при этом представляет изучение обмена сфинголипидов. Это связано с тем, что сфингомиелин и продукты его ферментативного гидролиза играют определяющую роль в сигнальной трансдукции, регулирующей ведущие клеточные процессы – иммунный ответ, пролиферацию, рост, дифференцировку и апоптоз клеток [4, 67].

К настоящему времени установлено, что при патологических состояниях организма изменяется состав и метаболизм сфинголипидов, что приводит к нарушению структуры и функций клеток [67].

Для выявления нарушения обмена сфинголипидов была изучена активность сфингомиелиназы, содержание сфингомиелина и церамидов в плазматических мембранах лимфоцитов. Как показали наши исследования у больных употребляющих опий-сырец, обработанный уксусным ангидридом, в период абстиненции нами были обнаружены изменения, проявляющиеся в увеличении содержания сфингомиелина, снижении содержания церамидов и повышении активности сфингомиелиназы. Нарушение обмена сфинголипидов в плазматических мембранах лимфоцитов были более

выражены у больных до начала лечения и у пациентов находившихся на стандартной схеме лечения.

Среди факторов, определяющих изменение активности сфингомиелиназы, является концентрация субстрата катализируемой реакции – сфингомиелина. Уровень сфингомиелина – это динамическая величина, которая определяется скоростью его синтеза *de novo* и скоростью его деградации под действием сфингомиелиназы. Таким образом, концентрация сфингомиелина может оставаться повышенной при увеличенной активности сфингомиелиназы, если синтез сфингомиелина *de novo* преобладает над его деградацией под действием фермента. Сфингомиелин и церамиды обладают разнонаправленным влиянием на различные клеточные процессы, а в регуляции митогенной активности, пролиферации, дифференцировки клеток и апоптозе даже являются антагонистами. Церамиды вызывают ингибирование протеинкиназы C и экспрессии bcl-2 (белка блокирующего апоптоз), выход кальция и активацию нуклеаз, снижают активность фосфолипазы D и модулируют активность других фосфолипаз, а также непосредственно изменяют транскрипционную активность ДНК [4, 67] и др. Данные эффекты лежат в основе антипролиферативного, противоопухолевого и других влияний церамидов. Сфингомиелин обладает противоположным эффектом на перечисленные выше внутриклеточные процессы. Накопление сфингомиелина связывают с развитием онкологических заболеваний, в отличие от церамидов, которые обладают антипролиферативным действием за счет индукции апоптоза поврежденных клеток [67].

Нарушения в обмене сфинголипидов могут приводить к дисбалансу в липидном обмене мембран лимфоцитов. Это является одним из основных факторов, обуславливающих нарушение функциональной активности лимфоцитов, формирование иммунодефицита и, как следствие, присоединение инфекционных заболеваний.

Существует 2 механизма повреждения липидов: перекисный и фосфолипазный. Известно, что эти типы повреждения липидов тесно взаимосвязаны. Окисленные фосфолипиды легче подвергаются гидролизу фосфолипазами, а фосфолипазы, в свою очередь, нарушая целостность липидного бислоя мембран, делают липиды более доступными для свободно-радикального окисления. Ведущую роль в фосфолипазном повреждении мембран играет фосфолипаза A_2 [22].

В нашей работе мы опередили активность двух типов фосфолипаз: A_2 и D. В результате проведенных исследований у больных опишной наркоманией в период абстиненции, нами были обнаружены увеличение активности данных фосфолипаз. Изменения активности фосфолипаз были более выражены у больных до начала лечения и у пациентов, находившихся на стандартной схеме лечения.

Причиной увеличения активности фосфолипаз может служить действие ФНО- α , основного цитокина, который вырабатывается при воспалении и обладает эффектом активации фосфолипаз. Также активация фосфолипаз при опишной наркомании может происходить в результате действия катехоламинов, выход которых в кровь возрастает при абстинентном синдроме [209]. В свою очередь активация ПОЛ может вызвать лабильзацию лизосом и способствовать высвобождению большей части популяции фосфолипаз [133]. Важную роль играет предшествующее воздействие на мембраны клеток протеолитических ферментов – трипсина, проназы, нейраминидазы, что в присутствии экзогенных фосфолипаз вызывает полное разрушение холинсодержащих фосфолипидов [198].

Продуктом гидролиза фосфолипидов фосфолипазой A_2 является лизофосфатидилхолин и ненасыщенные жирные кислоты, чаще – арахидоновая [22, 98].

Лизофосфолипиды – чрезвычайно цитотоксичные вещества, способные разрывать структуру биологических мембран [120, 159]. Нами было

выявлено увеличение количества лизофосфолипидов в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции. Особенно резкое увеличение содержания лизофосфолипидов было выявлено в группе больных до начала лечения и в группе больных, находившихся на стандартной схеме лечения. Также обнаруженное нами увеличение активности фосфолипазы D может служить причиной повышенной активности сфингомиелиназы, так как продукт действия фосфолипазы D – фосфатидная кислота является активатором сфингомиелиназы [22].

В связи с тем, что процесс ПОЛ может принимать активное участие в механизмах активации фосфолипаз и сфингомиелинового цикла, в нашей работе мы определили количество конечного продукта ПОЛ – ТБК-активных продуктов, а также активность ферментов, участвующих в антиокислительной защите: каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в плазматических мембранах лимфоцитов и сыворотке крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции. В ходе работы было выявлено увеличение содержания ТБК-активных продуктов, как в сыворотке, так и в плазматических мембранах лимфоцитов у больных опийной наркоманией. При этом происходило снижение активности каталазы и СОД. Эти изменения были более выражены в группе больных до начала лечения и в группе больных находившихся на стандартной схеме лечения.

Усиление процессов ПОЛ при опийной наркомании, возможно, происходит в результате активации прооксидантных систем. Длительная активация процессов ПОЛ приводит к истощению антиоксидантных систем организма. Комплексная оценка процессов ПОЛ и сопряженной с ними антиокислительной системы позволяет заключить, что в этиопатогенезе абстинентного синдрома при опийной наркомании важную роль играет развитие окислительного стресса [137,138].

Таким образом, в ПМ лимфоцитов и сыворотке крови больных опийной наркоманией отмечались определенные изменения показателей перекисного

окисления липидов. Наблюдаемое нами увеличение содержания ТБК-активных продуктов свидетельствовало об увеличении в лимфоцитах крови больных количества липопероксидов, которые нарушают клеточный гомеостаз, что, может привести к нарушению функций лимфоцитов, сопровождающихся появлением «запрещённых» клонов клеток, увеличением выработки провоспалительных цитокинов, уменьшением срока жизни клеток и т.д.

В регуляции состояния биологических мембран также принимают участие протеолитические ферменты. Уровень протеолитической активности существенно влияет на состояние клеточного метаболизма [166]. В основе деструктивных процессов, развивающихся после действия патологических факторов, лежит активация аутолиза, обусловленная избыточным содержанием лизосомальных ферментов в цитоплазме клетки.

В нашей работе было выявлено, что при опийной наркомании в состоянии абстинентного синдрома нарушается соотношение между протеиназами и ингибиторами в сторону преобладания протеолиза, что проявляется увеличением активности трипсина, снижением содержания плазминогена, появлением активного тромбина в крови и снижением активности ингибиторов протеиназ, таких как α_1 – ПИ, α_2 – МГ и антитромбин III. Эти изменения были более выражены в группе больных до начала лечения и в группе больных, находившихся на стандартной схеме лечения. Активация ПОЛ, о которой говорилось выше, может вызвать лабильзацию лизосом и способствовать высвобождению протеолитических ферментов. Освобождающиеся в увеличенном количестве протеолитические ферменты играют важную роль в повреждении липидного бислоя мембран [133]. Протеолитические ферменты, вызывая увеличение концентрации ФНО α в крови, активируют фосфолипазы и сфингомиелиназу, так как ФНО α обладает активирующим влиянием на данные ферменты.

Выше было продемонстрировано изменение липидного состава мембран лимфоцитов, компонентов обмена сфинголипидов и механизмов, регулирующих состояние биологических мембран (процессов ПОЛ,

активность фосфолипаз и протеолитических ферментов) у больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома. Вероятно, целенаправленная коррекция этих изменений может изменить течение абстинентного синдрома при опийной наркомании.

Предупреждение необратимого разрушения биомембран клеток – может успешно реализоваться сочетанным или отдельным использованием факторов - ингибиторов фосфолипаз, липаз, блокаторов кальциевого канала и т. д. [133]. Известно, что синдром отмены сопровождается увеличением содержания катехоламинов в крови [5]. Соединение катехоламинов с адренорецепторами приводит к увеличенному образованию цАМФ и этот “второй передатчик” активирует протеинкиназы – ферменты, фосфорилирующие белки, и прежде всего белки медленного канала транспорта Ca^{2+} . Большие дозы катехоламинов, действуя опосредованно через аденилатциклазную систему, вызывают увеличенное вхождение в клетки Ca^{2+} , избыток которого в сочетании с избытком свободных жирных кислот приводит к разобщению окисления с фосфорилированием в митохондриях и снижению содержания АТФ в клетках. При значительном и длительном избытке эндогенных катехоламинов механизмы самоограничения адренергического эффекта могут быть сорваны. Обусловленная избытком катехоламинов активация липаз, фосфолипаз, ПОЛ, достигая чрезмерного уровня, приводит к повреждению липидного бислоя мембран, и как следствие к нарушению функционирования липидзависимых ферментов, рецепторов и каналов ионной проницаемости [133]. Эти изменения можно в значительной степени предупредить введением β – адреноблокаторов.

Для решения этой задачи у больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома к схеме стандартного лечения (клофелин, нейролептики, седативные препараты) был добавлен β – АБ обзидан (пропранолол) в дозе 20 мг/сутки. В результате было выявлено, что у больных, находившихся на стандартном лечении в комплексе с β -АБ,

нарушения в липидном составе мембран лимфоцитов менее выражены, что проявляется меньшим повышением уровня ХС, ЛФЛ и меньшим снижением содержания ЭХ по сравнению с аналогичными показателями группы больных, находившихся на стандартной схеме лечения абстинентного синдрома. Нарушение отношения ХС/ФЛ менее выражено. Не выявлено достоверных нарушений в содержании суммарной фракции ФХ и ФС. Показатель трансмембранной асимметрии (мФЭА/оФЭА) достоверно не изменен. Положительное влияние β -АБ обзидана на липидный спектр плазматических мембран лимфоцитов больных, находившихся на комплексном лечении вероятно можно объяснить его стабилизирующим действием на плазматические мембраны лимфоцитов. [133, 192]. У данной группы пациентов менее выражены нарушения в обмене сфинголипидов, что проявляется недостоверным изменением содержания сфингомиелина и церамидов и менее значительным увеличением активности сфингомиелиназы.

В группе больных, находившихся на стандартном лечении в комплексе с β -АБ, изменения активности процессов ПОЛ были менее выражены, а активность антиоксидантных ферментов достоверно не изменялась по сравнению с группой контроля. Ингибирование ПОЛ приводит к снижению активности фосфолипазы A_2 и фосфолипазы D [133], которое мы наблюдали в группе больных, находившихся на комплексном лечении.

В данной группе больных изменения активности протеолитических ферментов и их ингибиторов, по сравнению с группой больных, находившихся на стандартном лечении, менее выражены. Так было обнаружено менее значительное увеличение активности трипсина и в меньшей степени было снижено содержание плазминогена и антитромбина III, а активность α_2 – МГ и α_1 – ПИ достоверно не отличалась от аналогичных показателей в группе здоровых доноров.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что применение β -АБ обзидана в дозе 20 мг/сутки в комплексе со стандартной терапией на фоне абстинентного синдрома при опийной наркомании может

существенно нормализовать показатели липидного спектра, обмена сфинголипидов плазматических мембран лимфоцитов и механизмов регулирующих состояние биологических мембран (перекисное окисление липидов, активность фосфолипаз и активность протеолитических ферментов крови).

Схема на рис. 15 резюмирует выше изложенные данные о патогенезе повреждения липидного спектра клеточных мембран при абстинентном синдроме у больных опийной наркоманией.

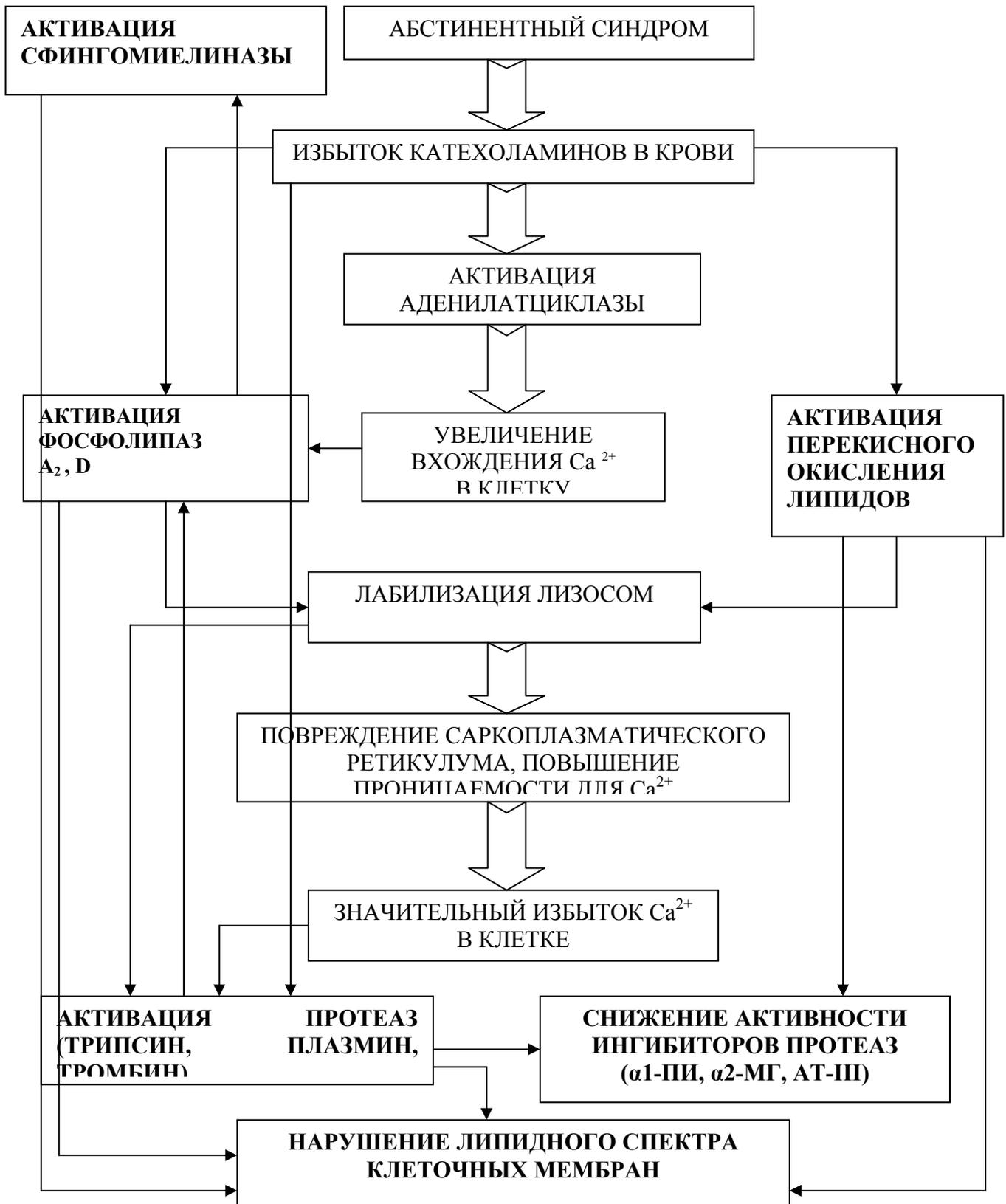


Рис. 15. Схема патогенетической цепи нарушения липидного спектра клеточных мембран при абстинентном синдроме у больных опийной наркоманией. Примечание: выделенные пункты – обнаруженные автором сдвиги.

Выводы

1. У больных опийной наркоманией, находившихся в состоянии абстинентного синдрома, в плазматических мембранах лимфоцитов регистрируются нарушения липидного спектра, которые проявляются в увеличении содержания холестерина, лизофосфолипидов, фосфатидилхолина и фосфатидилсерина и уменьшении содержания фосфатидилэтаноламина, эфиров холестерина, а также в изменении трансмембранной асимметрии распределения фосфатидилэтаноламина и отношения холестерина к фосфолипидам.

Кроме того, наблюдается нарушение обмена сфинголипидов, проявляющееся в увеличении содержания сфингомиелина, повышении активности сфингомиелиназы, уменьшении содержания церамидов.

2. В механизме нарушения липидного спектра и обмена сфинголипидов плазматических мембран лимфоцитов больных опийной наркоманией, находившихся в состоянии абстинентного синдрома, особую роль играют увеличение активности фосфолипазы A_2 , фосфолипазы D, усиление процессов перекисного окисления липидов и активация протеолитических систем крови.

3. При использовании стандартной схемы лечения абстинентного синдрома у больных опийной наркоманией не было выявлено положительных изменений со стороны липидного спектра, обмена сфинголипидов плазматических мембран лимфоцитов.

4. Включение обзидана в стандартную схему лечения абстинентного синдрома у больных опийной наркоманией нормализует липидный спектр и обмен сфинголипидов плазматических мембран лимфоцитов.

5. Механизм положительного влияния обзидана на липидный спектр и обмен сфинголипидов плазматических мембран лимфоцитов у больных опийной наркоманией, находившихся в состоянии абстинентного синдрома, связан со снижением активности фосфолипаз, угнетением процессов

перекисного окисления липидов и восстановлением баланса протеиназно-ингибиторной систем крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аболонин А. Ф. Клинические особенности острой интоксикации и синдрома отмены у больных опиатной зависимостью, сочетающейся с органическим заболеванием головного мозга / А. Ф. Аболонин // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2001. - №1 (19). – С. 50 – 53.
2. Авруцкий Г. Я., Недува А. А. Лечение психически больных / Г. Я. Авруцкий, А. А. Недува. – М.: Медицина, 1981. – 496 с.
3. Агеева Т.С. Структурно-функциональные свойства эритроцитарных мембран у больных с ишемическим инсультом и дисциркуляторной энцефалопатией / Т. С. Агеева, Н. Б. Захарова, А. А. Рассомахин // Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 1994. – Т. 94, вып. 1. – С. 7-8.
4. Алесенко А.В. Функции сфингомиелина в клеточной пролиферации и смерти / А.В. Алесенко // Биохимия. – 1998. - Т.63, № 1. – С. 75-82.
5. Анохина И. П. Биологические механизмы зависимости от психоактивных веществ / И.П. Анохина // Вопросы наркологии. – 1995. - №2. – С. 27 – 32.
6. Анохина И. П. Основные достижения в области наркологии, токсикомании, алкоголизма / И.П. Анохина, Н. Н. Иванец, В. Я. Дробышева // Вестник Российской Академии медицинских наук. – 1988. - №7. – С. 29 – 32.
7. Арушанян Э. Б. Психотропные свойства β - адреноблокаторов /Э. Б. Арушанян, Э. В. Бейер // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1994. – Т.57, №2. – С. 63 – 68.
8. Бабенко Н. А. Роль тиреоидных гормонов в регуляции активности фосфолипаз A_1 и A_2 в клетках и ядрах клеток печени крыс разного возраста / Н. А. Бабенко, Н. С. Кавок // Биохимия. – 1994. – Т.59, вып. 5. – С. 1130 – 1138.
9. Бабенко Н.А. Влияние тиреоидных гормонов и диацилглицеринов на метаболизм сфингомиелина в ядрах клеток печени крыс разного возраста / Н.А. Бабенко, И.С. Филоненко // Биохимия. – 1992. – Т.57, № 3. – С. 371-377.

10. Бабенко Н.А. Регуляция активности сфингомиелиназы и фосфолипаз плазматических мембран клеток печени крыс разного возраста / Н.А. Бабенко // Биохимия. – 1991 - Т.56, № 2. - С. 346-353.
11. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / В. А. Барабой // Успехи современной биологии.-1991.-Т.111, №6. -С.923-931.
12. Барабой В.А. Роль перекисного окисления в механизме стресса / В. А. Барабой // Физиол. журн.-1989.-Т.35,№5.-С.85-89.
13. Баринов Е. Х. Случай острого отравления героином / Е. Х. Баринов // Судебно-медицинская экспертиза. – 1999. - №4. – С. 38.
14. Баркаган. З. С. Основы диагностики нарушений гемостаза / З. С. Баркаган, А. П. Момот. – М.: “ Ньюдиамед-АО”, 1999. – 224 с.
15. Бергельсон Л.Д. Мембраны, молекулы, клетки / Л.Д. Бергельсон. - М.: Наука, 1982. - 317 с.
16. Бершова Т.В. Нарушение мембранных механизмов регуляции кальциевого гомеостаза при аритмиях сердца у детей / Т. В. Бершова, Г. Ф. Гордеева, Е. М. Васильева // Вопросы медицинской химии.-1994.-№1.-с. 39-41.
17. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте/ Е. Б. Бурлакова, А. В. Алексенко, Е. М. Молочкина и др.-М.:Наука,1975.-211с.
18. Биологические аспекты наркоманий / А. И. Майский, Н. Н. Ведерников, В. В. Чистяков, В. В. Ланкин. – М.: Медицина. – 1982. – 256 с.
19. Битенский В. С. Клинические и терапевтические аспекты наркоманий в подростковом возрасте: Автореферат дис... д-ра мед. наук. - М., 1991. – 36 с.
20. Болдырев.А.А. Введение в биохимию мембран / А. А. Болдырев. - М.: Высшая школа, 1986.- 332 с.
21. Бондаренко И. Г Прооксидантные и антиоксидантные системы печени в патогенезе цитолитического синдрома при вирусных гепатитах / И. Г. Бондаренко // Успехи гепатологии. – 1990. - вып.15. – С. 135 – 147.
22. Брокерхоф Х. Липолитические ферменты / Х. Брокерхоф, Р. Дженсен. – М.: Наука, 1978. – 400 с.

23. Брусов А.С. Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на автоокисление адреналина / А. С. Брусов, А. Н. Герасимов, Е. Ф. Панченко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.-1976.-Т.81,№1.- С.33-35.
24. Бубович В.И. Ранние стадии размножения миксовирусов и влияние на них ингибиторов / В. И. Бубович, Г. М. Рязанцева, М. К. Индулян - Рига: Зинатне, 1987.- 164 с.
25. Бурлакова Е.Б. Кинетические особенности токоферолов как антиоксидантов / Е. Б. Бурлакова, С. А. Крашаков, Н. Г. Храпова // Химическая физика.-1995.-Т.14,№10.-С.151-182.
26. Бурлакова Е.Б. Мембранные липиды как переносчики информации / Е.Б. Бурлакова, Г.В. Архипова, А.Н. Голощанов // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. - М.: Наука,1982. - С.21-37.
27. Бурлакова Е.Б. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиокислители / Е. Б. Бурлакова, Н. Г. Храпова // Успехи химии.-1985.-Т.54,№9.-С.1540-1558.
28. Бышевский А. Ш. Биохимия для врача / А. Ш. Бышевский, О. А. Терсенов. – Екатеринбург,1994.- 384 с.
29. Вагина О.Н. Взаимосвязь фосфолипидов и их гидролиза фосфолипазой D в модельных системах / О.Н. Вагина, М.В. Замараева // Биохимия. – 1995.- Т. 60, № 10. - С. 1569-1599.
30. Василенко И.А. Полиморфизм липидов модельных и биологических мембран / И. А. Василенко, В. Л. Боровягин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1990. – Т. 7, № 7. – С. 677-701.
31. Васильев А.В. Исследование системы антиоксидантной защиты у больных гипертонической болезнью при обогащении диеты полиненасыщенными жирными кислотами ω -3 ряда и токоферолом / А. В. Васильев, Г. В. Покровская // Вопросы медицинской химии.-1994.-№3.-С.53-56.

32. Веремеенко К. Н. Биохимия животных и человека / К. Н. Веремеенко. Киев, 1983. - Вып. 7. – с. 37-46.
33. Веремеенко К. Н. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике / К. Н. Веремеенко. - Киев, 1971. – 215 с.
34. Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И. Протеолиз в норме и при патологии / К. Н. Веремеенко, О. П. Голобородько, А. И. Кизим. – Киев, 1988.
35. Веремеенко. К. Н. α_1 – Ингибитор протеиназ и его исследование в клинике / К. Н. Веремеенко // Клиническая медицина. – 1985. - №12. – с. 21-27.
36. Витковский Ю. А. Влияние интерлейкина – 1 на свертываемость крови и фибринолиз / Ю. А. Витковский, В. И. Кузник // Гематология и трансфузиология. –1999. – Т.2. - №2. – С. 27 – 30.
37. Витковский Ю. А. Влияние свертывания крови и фибринолиза на содержание субпопуляций лимфоцитов, цитокинов и иммуноглобулинов / Ю. А. Витковский, В. И. Кузник // Тромбоз Гемостаз и Реология. – 2001. - №4. – С. 21 – 23.
38. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. - М.: Наука, 1972. – 252 с.
39. Владимиров Ю.А. Роль нарушений свойств липидного слоя мембран в развитии патологических процессов / Ю. А. Владимиров // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1989.- № 4. – С. 7-12.
40. Влияние спектра липопротеидов плазмы крови на уровень холестерина мембран эритроцитов / Т.И. Тарховская., Э.М. Халимов., Е.С. Фертинская и др. // Вопросы медицинской химии. – 1985. - № 4. – С. 83-87.
41. Влияние сфингомиелина и продуктов его ферментативного гидролиза на гетерологичное метилирование ДНК тимуса теленка цитозин-ДНК-метилтрансферазой EсоR II / Е.Б. Романенко, М.Ю. Пушкарева, А.В. Алесенко и др. //Биохимия. – 1991. – Т.56, № 2. – С.295-300.

42. Влияние фактора некроза опухоли на уровень свободного сфингозина и активность сфингомиелиназы в клетках и ядрах печени мышей / С. А. Русаков, Г. Н. Филиппова, М. Ю. Пушкарева и др. // Биохимия. -1993. –Т.58, №5. – С.724-731.
43. Возможность влияния мембранопатологических процессов на атерогенность гипертонической болезни / Л. И. Гапон, М. Ж. Шафер, А. Н. Кокарев и др. // Кардиология. – 1993. - №9. – с. 44 – 46.
44. Волькова Т.В. Окисленные производные холестерина способствуют переносу стероида между модельными липопротеидами и биологическими мембранами / Т. В. Волькова, О. М. Панасенко, О. А. Азизова // Биологические мембраны. –1988. – Т.5, №6. – с. 635 – 641.
45. Воскресенский О.Н. Антиоксидантная система, онтогенез и старение / О. Н. Воскресенский // Вопросы медицинской химии.-1992.-№4.-С. 21.
46. Воскресенский О.Н. Антиоксидантная система, онтогенез и старение / О. Н. Воскресенский, И. А. Жутаев // Вопросы медицинской химии.-1994.-№3.- С.53-56.
47. Врублевский А. Г. Клинический патоморфоз опийного абстинентного синдрома / А. Г. Врублевский, М. Л. Рохлина, А. Ф. Радченко // Вопросы наркологии. – 1990. - №2. – С. 23 – 25.
48. Врублевский А. Г. Соматические последствия потребления психоактивных веществ / А. Г. Врублевский, И. П. Анохина, В. П. Нужный // Токсикологический вестник. – 1995. - №4. – С. 2 – 5.
49. Гаврилов В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов / В. Б. Гаврилов, М. И. Мишкорудная // Лабораторное дело.-1983.-№3.-С.33-36.
50. Газохроматографический анализ жирных кислот липопротеинов при инфаркте миокарда / Т.С. Брюзгина., Е.Н. Амосова., Г.Б. Афолина и др. // Клиническая лабораторная диагностика. –1997. – № 12. – С. 14-15.
51. Гамалея Н. Б Особенности гуморального иммунитета у больных наркоманиями / Н. Б. Гамалея // Вопросы наркологии. – 1990. -№2. –

52. Геннис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции / Р. Геннис; Пер. с англ. – М.: Мир, 1997 – 624 с.
53. Грибанов Г.А. Особенности структуры и биологическая роль лизофосфолипидов / Г.А. Грибанов // Вопр. мед. химии. – 1991. – Т.37, № 4. – С. 2-10.
54. Груздева К. Н. Фосфолипидный состав, перекисное окисление липидов и активность некоторых ферментов органоидов гепатоцитов при алкогольной интоксикации / К. Н. Груздева, Б. А. Антифьева, В. П. Елисеева // Вопросы медицинской химии. – 1980. - №2. – С. 165 – 169.
55. Давиденкова Е.Ф. Миелопероксидаза нейтрофилов в крови и ее возможное участие в процессах перекисного окисления липидов при атеросклерозе / Е. Ф. Давиденкова //Клиническая медицина.-1989.-№6.-С.56-58.
56. Давиденкова Е.Ф. Показатели липидного обмена и системы перекисного окисления липидов с учетом наследственной предрасположенности к атеросклеротической сосудистой патологии / Е. Ф. Давиденкова, И. С. Либерман, Ю. И. Строев //Кардиология.-1991.-№8.-С.41-45.
57. Дворецкий А.И. Эндогенный Фосфолипазный гидролиз при лучевом поражении животных / А.И. Дворецкий, С.В. Анненкова // Радиобиология. – 1987. - Т.27, № 1. - С. 97-99.
58. Девятина Т.А. Коррекция перекисного окисления при стрессе / Т. А. Девятина, В. В. Бречко //Физиологический журнал.-1989.-№5.-С.14-18.
59. Ди Марцо В. 2-Arachidonoyl-glycerol эндоканабиноид: повышенное внимание для раньше пренебрегающегося метаболита / В. Ди Марцо // Биохимия. – 1998. – Т.63, № 1. – С. 16-26.
60. Дмитриев Л.Ф. Биохимические аспекты атерогенеза: роль антиоксидантов / Л. Ф. Дмитриев //Терапевтический архив.-1995.-№12.-С.73-77.
61. Дмитриева Н.В. Клиническое значение структурной характеристики биомембран и показателей ПОЛ в оценке тяжести ожирения у детей / Н. В.

- Дмитриева, Т. Н. Кожевникова, Т. В. Кудрявцева // Вопросы охраны материнства и детства. – 1985. - №11. – С. 24.
62. Дубинина Е.Е. Биологическая роль супероксидного анион-радикала и супероксиддисмутазы в тканях организма / Е. Е. Дубинина // Успехи современной биологии.-1989.-Т.108,№1(4).-С.3-9.
63. Дубинина Е.Е. Характеристика внеклеточной супероксиддисмутазы / Е. Е. Дубинина // Вопросы медицинской химии.-1995.-Т.41,№6.-С.8-12.
64. Дубровин С. М. α_2 – Макроглобулин: современное состояние вопроса / С. М. Дубровин, А. В. Муромцев, Л. И. Новикова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. - №6. – С. 3 – 7.
65. Дятловицкая Э.В. Зависимость биоэфекторных свойств сфинголипидов от строения их гидрофобного фрагмента / Э.В. Дятловицкая // Биохимия. – 1998. – Т.63, № 1. – С. 67-74.
66. Дятловицкая Э.В. Липиды как биоэфекторы / Э,В. Дятловицкая, В.В. Безуглов // Биохимия. – 1998. – Т.63, № 1. – С. 3-5.
67. Дятловицкая Э.В. Сфинголипиды и злокачественный рост / Э,В. Дятловицкая // Биохимия. – 1995. – Т.60, № 6. – С. 843-849.
68. Жданов В.М. Вирусные гепатиты / В.М. Жданов, В.А. Ананьев, В.М. Стаханова. - М.: Медицина, 1986. - 104 с.
69. Жданов Р.И. Фосфолипид-нуклеиновые взаимодействия / Р.И. Жданов // Вопросы медицинской химии. – 1999. – Т.45, № 5. – С. 437-438.
70. Жижина Г.П. Корреляция деградации ДНК, индуцированной фактором некроза опухоли-альфа, с накоплением сфингозина в ядре и перекисей в ДНК / Г,П. Жижина, В.Г. Коробко, А.В. Алесенко // Биохимия. – 1994. – Т.59,№ 11. – С. 1756-1765.
71. Жухоров Л.С. Метод количественного определения липидов в лимфоцитах и нейтрофилах периферической крови / Л. С. Жухоров, С. А. Голованов // Лабораторное дело.-1984.-№11.-с.683-685.

72. Заболевания легких у больных наркоманией / Е. И. Геращенко, Ю. С. Ландышев, А. В. Суров // Международный конгресс “Интерастма - 98” (Москва, октябрь 1998): Сборник – резюме. – Москва, 1998. – С.315.
73. Забродина З.В. Метаболические реакции и перекисное окисление липидов у детей-дошкольников в момент обострения экологической ситуации / З. В. Забродина, Л. Г. Горохова // Гигиена и санитария. – 1993. – № 5. – С.18–24.
74. Зайчик А. Ш. Основы общей патологии. Часть 1. Основы общей патофизиологии. (Учебное пособие для студентов медВУЗов) / А. Ш. Зайчик, Л. П. Чурилов. – СПб., 1999. – 624 с.
75. Зборовская И.А. Антиоксидантная система организма, ее значение в метаболизме. Клинические аспекты / И. А. Зборовская, М. В. Банникова // Вестник РАМН.-1995.-№6.-С.53-60.
76. Звартау Э.Э. Современные подходы к применению лекарственных средств при лечении наркоманий и токсикоманий / Э. Э. Звартау // Вопросы наркологии. – 1990. - №2. – С. 50 – 52.
77. Зелинский Б.А. Спектр ФЛ сыворотки крови и мембран эритроцитов у больных сахарным диабетом и влияние на него антиоксидантов / Б. А. Зелинский, А. В. Паламарчук // Проблемы эндокринологии - 1984.- №2.- С.14-17.
78. Зенков Н.К. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах / Н. К. Зенков, Е. Б. Меньшикова // Успехи современной биологии. - 1993.-Т.113,№3.-С.286-296.
79. Зорин Н. А. Семейство макроглобулинов / Н. А. Зорин, Р. М. Зорина, В. С. Горин // Клиническая лабораторная диагностика. – 1993. - №1. – С. 52 – 56.
80. Зубаиров Д.М. Динамика активности 5-нуклеотидазы в плазме крови при экспериментальном инфаркте миокарда / Д. М. Зубаиров, И. А. Андрушко, И. А. Латфуллин // Кардиология. – 1981.- т.21,№8. – С. 47 – 49.

81. Зуева О.М. Состояние мембран эритроцитов и их функциональные свойства в постреанимационном периоде / О. М. Зуева, А. С. Лебедев, В. Г. Корпачев // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1989. - № 4. – С. 22-24.
82. Иванец Н. Н. Современное состояние проблемы наркоманий в России / Н. Н. Иванец, И. П. Анохина, Н. В. Стрелец // Вопросы наркологии. – 1997. – № 3. – С. 3 – 12.
83. Иванов Е. П. Руководство по гемостазиологии: (Нормальные и нарушенные функции системы гемостаза, клинико-лабораторная диагностика кровотечений, тромбозов и ДВС-синдрома.) / Е. П. Иванов. – Мн.: Беларусь, 1991. – 302 с.
84. Извекова В.А. Липиды мембран и функции иммунокомпетентных клеток в норме и при патологии / В. А. Извекова // Успехи современной биологии. – 1991. – т.111, Вып 4. – с. 577 – 590.
85. Изменение активности нейтральной и кислой изоформ сфингомиелиназы в гепатоме – 22, в регенерирующей и ишемизированной печени / А.В. Алесенко, Е.С. Зубова, Л.Б. Дудник и др. // Вопросы мед. химии. – 1999. – Т.45, № 6. – С. 472-481.
86. Изменение уровня сфингозина в ядрах печени крыс при индуцированной суперэкспрессии онкогенов циклогесемедином / А.В. Алесенко, П.Я. Бойков, Л.Б. Дробот и др. // Биохимия. – 1994. – Т.59, № 7. – С. 1076-1087.
87. Изменение уровня эндогенного сфингозина в ядрах регенерирующей печени крыс / А.В. Алесенко, Э.А. Пантаз, М.Ю. Пушкарева и др. // Биохимия. – 1993. – Т.58, № 3. – С. 461-470.
88. Изучение иммунномодулирующих свойств фосфолипидов / Н.Г. Синилова., А.П. Дуплищева., Г.Б. Кирилличева и др. // Вопросы медицинской химии. – 1990. - № 3. – С. 34-36.
89. Иммунореактивность и атеросклероз. / Под ред. А. Н. Климова. – Л., 1986. – 178 с.

90. Иммунохимия в клинической лабораторной практике. / Под ред. А. М. Уорда, Дж. Т. Уичера - М., 1984.
91. К вопросу о механизмах участия иммунной системы в патогенезе опиоидной зависимости / Н. Б. Гамалея, К. А. Мондрус, С. И. Тронников и др. // Вопросы наркологии. – 1992. - №2-3. – С. 113 – 115.
92. Каган В.Е. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов / В.Е. Каган, О.Н. Орлов, Л.Л. Прилипко // Итоги науки и техники. Серия биофизика. - М.:ВИНИТИ, 1986. - Т.18. – С.120.
93. Калинин М. Н. Влияние алкоголя на фосфолипидный состав митохондрий миокарда человека / М. Н. Калинин, Д. И. Бельченко // Вопросы медицинской химии. – 1985. - №4. – С. 10-13.
94. Каплан О.В. Липиды эритроцитов и газотранспортная функция крови при острой кровопотере / О. В. Каплан // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, № 2. – С. 23-25.
95. Каплан. Г. Клиническая психиатрия: Пер. с англ. / Г. Каплан, Б. Сэдок; Под ред. Т. Б. Дмитриева.- М.: ГЭОТАР МЕД, 1998. – С. 84 – 87.
96. Клебанов Г.И. Изучение фазовых переходов модельных и БМ / Г. И. Клебанов, Е. В. Никушкин, Ю. А. Владимиров // Биофизика.-1978.-Т.23, Вып.2.- С.261-265.
97. Коган А.Х. Кислородные свободно-радикальные процессы в патогенезе ишемической болезни сердца / А. Х. Коган, А. Л. Сыркин, С. В. Дриницина // Кардиология.-1997.-№12.-С.67-73.
98. Когтева Г.С. Ненасыщенные жирные кислоты как эндогенные биорегуляторы / Г.С. Когтева, В.В. Безуглов // Биохимия. – 1998. – Т.63, № 1. – С. 6-16.
99. Козлов Ю.П. Свободно-радикальное окисление липидов в биомембранах / Ю.П. Козлов. - М.: МГУ, 1972.
100. Козлов Ю.П. Свободные радикалы и их роль в норме и патологии / Ю.П. Козлов. - М.: МГУ, 1973. – 124 с.

101. Козловский В. Л. Фармакологические свойства блокаторов кальциевых каналов и перспективы их применения в психиатрии и неврологии / В. Л. Козловский // Журнал неврологии и психиатрии им. Корсакова. – 1994. - №1. – С. 104 – 108.
102. Колб В.Г. Справочник по клинической биохимии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск, 1982.
103. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – М.: ВШ, 1980. – С. 26 –28.
104. Кузник Б. И. Взаимосвязь между иммуногенезом и системой гемостаза: единая защитная система организма / Б. И. Кузник, Н. Н. Цыбиков // Успехи современной биологии. – 1981. - №2. – С. 243 – 260.
105. Кузник Б. И. Иммунный ответ и система гемостаза / Б. И. Кузник, Ю. А. Витковский // Проблемы физиологии и патологии системы гемостаза. Барнаул, 2000. – С.119 – 127.
106. Кузник Б. И. Иммуногенез, гемостаз и неспецифическая резистентность организма / Б. И. Кузник, Н. В. Васильев, Н. Н. Цыбиков - М.: Медицина, 1989. - 320 с.
107. Кузьменко Д.И. Биоэнергетический метаболизм лимфоцитов при ишемической болезни сердца / Д. И. Кузьменко, А. В. Балабанов, О. Ю. Романько // Кардиология. – 1987. – т.27, №10. – С.59.
108. Кузьменко Д.И. Коррекция нарушений при токсическом гепатите комплексным воздействием модифицированными природными преформированными физическими факторами: Дис. на соискание учёной степени д-ра мед. наук. – Томск, 1999. –273 с.
109. Кузьмина Ю.В. Иммунохимия фосфолипидов / Ю. В. Кузьмина, А. П. Каплун, В. И. Швец // Биологические мембраны. – 1991. - № 8. – С. 1013-1027.
110. Куликов В.И. Биорегуляторная роль фактора агрегации тромбоцитов во внутриклеточном и межклеточном взаимодействии / В.И. Куликов, Г.И. Музя // Биохимия. – 1998. – Т.63. – С. 57-66.

111. Кулкыбаев Г. А. Влияние факторов питания на перекисное окисление липидов в микросомах крыс разного возраста / Г. А. Кулкыбаев // Вопросы питания. – 1992. - №4. – С. 53 – 56.
112. Кухтина Е.Н. Изменение физико - химических характеристик липидов печени при введении смеси ненасыщенных жирных кислот / Е. Н. Кухтина, Н. Г. Храпова //Биохимия.-1988.-№9.-С.1479-1485.
113. Ланкин В.З. Перекиси липидов и атеросклероз / В. З. Ланкин //Кардиология.-1980.-№8.-С.42-48.
114. Ланкин В.З. Роль перекисного окисления в этиологии и патогенезе атеросклероза / В. З. Ланкин, А. М. Вихерт, А. К. Тихазе // Вопросы медицинской химии. – 1989. – Вып.3. – С. 18 – 24.
115. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа. 1980. – 349 с.
116. Лапшина Е.А. Структурные изменения эритроцитарной мембраны в присутствии свободных жирных кислот и их производных / Е. А. Лапшина, Н. Б. Заводник // Биологические мембраны. – 1995. – т.12, №2. – С.163.
117. Ледванова Т. Ю. Изменение электрокинетической подвижности и функциональной активности лимфоцитов крови у больных опийной наркоманией / Т. Ю. Ледванова, М. Ю. Ледванов, В. В. Фирсова // Вопросы наркологии. – 1998. - №3. – С. 71 – 76.
118. Ленинджер А. Основы биохимии / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – т.2. – С.586.
119. Лимфоциты: выделение, фракционирование, характеристика./ Под ред. Дж. Натвина, П. Перлманка, Х. Вигзеля. – М., 1980. – С. 267-291.
120. Литвиненко Н. М. Эндогенные фосфолипазы A_2 : структура и функция / Н. М. Литвиненко, М. А. Кисель. – Минск, 1991.
121. Локшина Л. А. Протеолитические ферменты в регуляции биологических процессов / Л. А. Локшина // Биоорганическая химия. – 1994. - Т.20, №2. – С. 134 – 142.
122. Мажуль. Л. М. Перекисное окисление липидов и физико-химическое состояние плазматических мембран печени при гипер- и гипоинсулинемии /

Л. М. Мажуль, С. М. Якубовский, Г. Г. Егуткин // Проблемы эндокринологии. – 1989. - №4. – С. 61 – 63.

123. Макаревич О.П. Активность супероксиддисмутазы крови в острый период различных заболеваний / О. П. Макаревич, П. П. Голиков // Лабораторное дело.- 1983.- №6.- С.24-27.

124. Малин. Д. И. Плазмаферез в психиатрии и наркологии: Руководство для врачей / Д. И. Малин. - М., 1997. - 144 с.

125. Мамедгасанов. Р. М. Динамика перекисного окисления липидов у больных инсулиннезависимым типом сахарного диабета / Р. М. Мамедгасанов, С. А. Рахмани // Проблемы эндокринологии. – 1989. - №1. – С. 19 – 20.

126. Мандель А. И. Анализ смертности от передозировки наркотиков при опийной наркомании / А. И. Мандель // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2000. - №2. – С. 45-47.

127. Мандель А. И. Клинико-морфологические последствия хронической опийной интоксикации / А. И. Мандель, Ю. А. Шамарин // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2001. - №2 (20). – С. 45 – 48.

128. Мандель А. И. Психофармакотерапия опийной наркомании (обзор современных методов лечения) / А. И. Мандель, Н. А. Бохан // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 1999. - №2-3. – С. 101 – 106.

129. Мартынова Е.А. Влияние сфинголипидов на активацию Т-лимфоцитов / Е.А. Мартынова // Биохимия. – 1998. – Т.63, № 1. – С.122-132.

130. Маттик Р. П. Эффективны ли программы дезинтоксикации? / Р. П. Маттик, У. Хэлл // Русский медицинский журнал. –1996. – Т.4, №1. –С. 32 – 39.

131. Маянский А.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге / А. Н. Маянский, Д. Н. Маянский. - Новосибирск: Наука. Сиб. Отделение, 1983. - 256 с.

132. Меджитов Р.М. bcl – 2 белок внутренней мембраны митохондрий, блокирующий запрограммированную смерть клетки / Р.М. Меджитов // Биохимия. – 1991. – Т.56, № 10. – С. 1916-1918.

133. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессовых и ишемических повреждений сердца / Ф. З. Меерсон. - М.: Медицина, 1984.-269 с.
134. Меньшикова Е.Б. / Е. Б. Меньшикова, Н. К. Зенков // Терапевтический архив. – 1991. - №11. – С. 85.
135. Меньшикова Е.Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е. Б. Меньшикова, Н. К. Зенков // Успехи современной биологии.-1993.-Т.113, №4.- С.442-455.
136. Меньшикова Е.Б. Молекулярно-клеточные механизмы развития «окислительного стресса»: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.- Нов-к, 1997.-48с.
137. Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс при воспалении / Е. Б. Меньшикова, Н. К. Зенков // Успехи современной биологии.-1997.-Т.117, №2.-С.155-171.
138. Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс при ишемическом и реперфузионном повреждении миокарда / Е. Б. Меньшикова, Н. К. Зенков // Успехи современной биологии.-1997.-Т.117, №3.- С.362 - 373.
139. Мещеряков А. Ф. Центральные механизмы формирования морфиновой зависимости / А. Ф. Мещеряков, С. К. Судаков // Вопросы наркологии. – 1991. - №2. – С. 33 – 38.
140. Микаелян Э. М. Взаимосвязь антиоксидантов и перекисного окисления липидов / Э. М. Микаелян, М. М. Мелколян // Журнал экспериментальной и клинической медицины. – 1983. – Т.23, №6. – С. 537 – 544.
141. Мишин Ю. Б. – В кн.: Актуальные вопросы этиологии и патогенеза опухолей. М., 1982. – С. 68-74.
142. Момот. А. П. Методика и клиническое значение паракоагуляционного фенантролинового теста / А. П. Момот, В. А. Елыкомов, З. С. Баркаган // Клиническая лабораторная диагностика. – 1996. - №4. – С. 17-20.
143. Нагорнев В.А. Атерогенез и иммунное воспаление / В. А. Нагорнев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1996. – т.122, №7. – С. 4 – 8.

144. Надежность клеток и тканей / Е. Б. Бурлакова, Г. В. Архипова, Н. П. Пальмина, Е. М. Молочкина.- Киев: Наук.думка, 1980. – 34 с.
145. Назаров П.В. Качественный и количественный состав фосфолипидов биомембран в условиях токсического действия фенола и корректирование витаминами К и Е: Автореф.дисс.....канд. мед. наук. - Уфа.,1997.
146. Найденова Н. Г. Клинические особенности и течение опийной наркомании, осложненной димедроловой токсикоманией / Н. Г. Найденова, А. Ф. Радченко, И. Б. Власова // Вопросы наркологии. – 1993. - №1. – С. 21-23.
147. Наркомании, токсикомании и их лечение: Методические рекомендации / Сост. А. Г. Гофман, В. В. Бориневич, Д. А. Черняховский и др. - М., 1979. - 48 с.
148. Нартикова. В. Ф. / В. Ф. Нартикова, Т. С. Пасхина // Вопросы медицинской химии. – 1979. – Т.25, №4. – С.494-498.
149. Нарушение обмена липидов и морфофункциональная нестабильность мембран эритроцитов у больных с терминальной почечной недостаточностью / Ю.И. Гринштейн, В.П. Терещенко, Ю.А. Терещенко, В.Я. Романова // Терапевтический архив. – 1990. - № 6. – С. 84-88.
150. Нелаева А.А. Клинико-патогенетическая оценка структуры и функций мембран лимфоцитов периферической крови при инсулинзависимом сахарном диабете / А. А. Нелаева, Э. Н. Кашуба, Ю. И. Кардаков // Проблемы эндокринологии. – 1990. - №5. – С. 24 – 28.
151. Немедикаментозные методы лечения наркомании, токсикомании и алкоголизма: Методические рекомендации / Сост. И. К. Сосин, О. С. Слабунов, Г. Н. Мысько и др. - Харьков, 1990. - 22 с.
152. Обмен моноаминов при различных формах парафилий / Б. М. Коган, Н. А. Ткаченко, А. З. Дроздов, и др. // Журнал невропатологии и психиатрии. – 1995. – Вып. 6. – С. 52 – 56.

153. Определение вида наркотических средств, получаемых из конопли и мака: Методические рекомендации / под ред. Э. А. Бабаяна. – М.: ЭКЦ МВД России, РФЦСЭ МЮ России. – 1995. – 24 с.
154. Осипов С.Г. Иммунные комплексы и атеросклероз / С. Г. Осипов, В. Н. Титов // Кардиология. – 1982. – Т.22, №7. – С. 119 – 125.
155. Особенности клеточного и гуморального иммунитета у больных опишной и эфедроновой наркоманией / С. Н. Климова, Л. И. Ульянова, И. Б. Гамалея, Е. П. Горшкова // Вопросы наркологии. – 1994. - №2. – С. 54 – 57.
156. Особенности клинического течения пневмонии и показатели функции внешнего дыхания у лиц больных наркоманией и хроническим алкоголизмом / Е. И. Геращенко, С. Ю. Кузнецова // Международный конгресс “Интерастма - 98” (Москва, октябрь 1998): Сборник – резюме. – Москва, 1998. – С.316.
157. Осташевская Н. Г. К вопросу о висцеральной патологии при наркомании кустарными препаратами опия / Н. Г. Осташевская, А. А. Надточий // Алкоголизм и неалкогольные токсикомании.- М.: МЗ РСФСР. – 1987. – С. 94 – 97.
158. Панченко Л. Ф. Антиоксидантные системы и перекисное окисление липидов при наркоманической интоксикации / Л. Ф. Панченко, С. В. Пирожков, А. Г. Соловьева // Вопросы наркологии. – 1995. - №2. – С. 32 – 35.
159. Патогенетическое, клиническое и диагностическое значение фосфолипазы A_2 в патогенезе панкреатитов (обзор литературы) / Н. Б. Губергриц, Г. М. Лукашевич, К. М. Загоренко и др // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. - №5. – С. 3 – 8.
160. Петрухина Г.Н. Естественный эйказаноид в регуляции коагуляции крови / Г.Н. Петрухина, В.А. Макаров // Биохимия. – 1998. – Т.63, № 1. – С. 111-121.
161. Погосов А. В. История и современное состояние вопроса терапии наркоманий опишной группы / А. В. Погосов, Н. А. Бохан, С. Б. Останков // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2001. - №4. – С. 56 – 64.

162. Приложение к приказу Минздрава России от 28.04.1998 №140 “Стандарты (модели протоколов) диагностики и лечения наркологических больных”. М., 1998.
163. Проинова В. А. Токсические свойства и особенности фармакокинетики наркотических анальгетиков / В. А. Проинова // Токсикологический вестник. – 1995. - №4. – С. 20 – 23.
164. Проказова Н.В. Влияние лизофосфотидилхолина на передачу трансмембранного сигнала внутрь клетки / Н.В. Проказова, Н.Д. Звездина, А.А. Коротаева // Биохимия. – 1998. – Т.63, № 1. – С. 38-47.
165. Проказова Н.В. Эффект лизофосфатидилхолина в трансмембранной передаче сигнала / Н.В. Проказова, Н.Д. Звездина, А.А. Коротаева // Биохимия. – 1999. – Т.63, № 1. – С. 46-54.
166. Протеолитические ферменты / Т. С. Пасхина, Г. А. Яровая, К. Н. Веремеенко, О. П. Голобородько, А. И. Кизим. – Киев, 1988. – 165 с.
167. Проценко. В.А. Ингибиторы протеолитических ферментов – протекторы клеточных повреждений / В. А. Проценко, С. И. Шпак // Успехи современной биологии. – 1988.- Т. 106, Вып.2(5).- С. 255-263.
168. Прусаченко В. К. / В. К. Прусаченко // Фармакология и токсикология. – 1981. - №4. – С. 417 – 419.
169. Пушкарева М.Ю. Изучение уровня активности сфингомиелиназы и содержания сфингомиелина и церамидов в сравнении с другими функциями липидов клеточного ядра регенерирующей печени крыс / М.Ю. Пушкарева, О.В. Боровкова, А.В. Алесенко // Биохимия. – 1991. – Т.56, № 5. – С. 903-912.
170. Пятницкая И. Н. Клиническая наркология / И. Н. Пятницкая. – М., 1975.
171. Пятницкая И. Н. Наркомании: Руководство для врачей / И. Н. Пятницкая.- М.: Медицина. – 1994. – 544 с.
172. Региональная динамика наркологической ситуации за 10 лет / А. И. Мандель, Н. А. Бохан, Е. М. Редченкова, А. Ф. Аболонин // Актуальные вопросы психиатрии. Томск. – 1997. – Вып. 8. – С. 107 – 109.

173. Розен В.Б. Суперсемейство ядерных гормональных рецепторов – адаптивных факторов транскрипции / В.Б. Розен // Биохимия. – 1991. – Т.56, № 3. – С. 565-571.
174. Ройт А. Основы иммунологии: Пер. с англ. / А. Ройт. – М., 1991.
175. Роль сфингозин-1-фосфата в клеточном росте, пролиферации и смерти / С. Шпигель, О. Кувилье, Л. Эдзаль и др. // Биохимия. – 1998. – Т.63, № 1. – С. 83-88.
176. Рылова С.Н. Сравнительное исследование состава сфингоидных оснований и жирных кислот в церамидах и сфингомиелинах злокачественных опухолей и нормальных тканей яичников человека / С.Н. Рылова, О.Г. Сомова, Э.В. Дятловицкая // Биохимия. – 1998. – Т.63, № 9. – С. 1238-1242.
177. Савченко А.А. Возрастная динамика метаболических показателей лимфоцитов крови / А. А. Савченко // Физиология человека. – 1994. – Т.20. - №1. – С. 109 – 113.
178. Сайфутдинов Р.И. Изменение активности антиоксидантных ферментов у больных с хронической сердечной недостаточностью / Р. И. Сайфутдинов, А. И. Коц // Кардиология.-1990.- №3.- С.65-68.
179. Сала А. Лейкотриены: липидные биоэффекторы воспалительных реакций / А. Сала, С. Зарини, М. Болла // Биохимия. – 1998. – Т.63, № 1. – С. 101-110.
180. Селедцов А. М. Патокинетические и психопатологические особенности опийной наркомании, сформировавшейся на органически неполноценной почве / А. М. Селедцов // Вопросы наркологии. – 1991. - №1. – С. 27 – 28.
181. Селедцов А. М. Псиоорганические расстройства при злоупотреблении различными психоактивными веществами (психопатология, клиника, патогенез, терапия): Автореферат дис.... д-ра мед. наук. - М., 1994. - 39 с.
182. Семченко В.А. Механизмы патологических реакций / В. А. Семченко, Н. Н. Классен, С. С. Степанов. - Томск, - 1982. – Т.2. – 109 с.

183. Сергеев П. В. β – адренергические средства и лизосомы миокарда / П. В. Сергеев, Н. А. Сысолятина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1993. – Т. 56, №1. – С. 65 – 66.
184. Сим Э. Биохимия мембран / Э. Сим. – М.: Мир, 1982. – С. 12 – 55.
185. Скакун Н. П. Клиническая фармакология гемопротекторов / Н. П. Скакун, В. В. Шмалько. - Тернополь, 1995.
186. Слюсарь Н.Н. Изменение показателей содержания фосфатидилинозитола а иммунокомпетентных клетках онкологических больных / Н. Н. Слюсарь, А. В. Каргаполов // Иммунология. – 1991. - №2. – С. 62 – 63.
187. Староверов А. Т. Клиника и терапия абстинентного синдрома при употреблении кустарно изготовленных препаратов мака / А. Т. Староверов, А. Н. Хлебников, В. А. Устинов // Проблемы медико-социальной реабилитации больных в психиатрии и наркологии. – М.: Медицина. – 1992. – С. 106 – 108.
188. Сторожок С.А. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства / С. А. Сторожок, А. Г. Санников, Ю. М. Захаров. – Тюмень, 1997. – 140 с.
189. Струкова С. М Тромбин – регулятор процессов воспаления и репарации тканей / С. М. Струкова // Биохимия. – 2001. – Т.66, Вып.1. – С. 14 – 27.
190. Стручков В.А. Структурные и функциональные аспекты ядерных липидов нормальных и опухолевых клеток / В.А. Стручков, Н.Б. Стражевская // Биохимия. – 2000. – Т.65, № 5. – С. 620-643.
191. Сыромятникова Н. В. Метаболическая активность легких / Н. В. Сыромятникова, В. А. Гончарова, Т. В. Котенко. – Л., 1987.
192. Сысолятина Н. А Влияние пропранолола и флузоксоллола на активность лизосомальных ферментов миокарда желудочков крыс / Н. А. Сысолятина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1992. - №5. – С. 33 – 36.

193. Тертов В.В. Механизмы внутриклеточного накопления липидов, вызванного модифицированными липопротеидами / В.В. Тертов // Проблемы атеросклероза / Под ред. А.Е.Чазова. - М.,1991. - С. 35-47.
194. Титов В.Н. Патогенез атеросклероза для XXI века / В. Н. Титов //Клиническая лабораторная диагностика .- 1998.- №1.-С.3-11.
195. Ткачук В.А. Фосфоинозитидный обмен и осциляция ионов кальция / В.А. Ткачук // Биохимия. – 1998. – Т.63, № 1. – С. 47-56.
196. Трипсинемия в реакциях организма на повреждения / Е. Н. Мешалкин, В. С. Сергиевский, А. В. Сувернев, Г. К. Глейм. - Новосибирск: Наука. Сиб. Отделение, 1982. - 82 с.
197. Ушкалова В.Н. Контроль перекисного окисления липидов / В. Н. Ушкалова, И. В. Иоанидис. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1993. – 181с.
198. Фосфолипазы человека в норме и при патологии / Ю. Е. Вельтищев, Э. А. Юрьева, М. А. Мусаев, Г. Ф. Шеманова // Вопросы медицинской химии. – 1981. - №4. – С. 441 – 449.
199. Финдлей Дж., Эванс С. Биологические мембраны: Пер. с англ. – М., 1991.
200. Футерман А. Роль церамидов в регулировании роста и развития нейронов / А. Футерман // Биохимия. – 1998. – Т.63, № 1. – С. 89-100.
201. Хансон К.П. Программированная клеточная гибель (апоптоз): молекулярные механизмы и роль в биологии и медицине / К.П. Хансон // Вопросы медицинской химии. – 1997. – Т.43, № 5. – С. 402-415.
202. Холестериноз / Ю. М. Лопухин, А. И. Арчаков, Ю. А. Владимиров, Э. М. Коган. – М.: Медицина., 1983. – С. 41 – 100.
203. Холодова Ю.Д. Структурно-функциональные особенности мембран с различным содержанием холестерина / Ю. Д. Холодова // Украинский биохимический журнал. – 1981. – Т.53, №5. – С. 114 – 126.
204. Цыбиков Н. Н. Иммуный механизм регуляции гемостаза / Н. Н. Цыбиков, Б. И. Кузник // Проблемы гематологических переливаний крови. – 1986. - №2. – С. 23 – 28.

205. Чекман И.С. Микросомальная ферментная система организма / И. С. Чекман, А. Е. Посохова, Е. Г. Береговиц. – Киев: Наукова думка, 1996. – 50 с.
206. Черницкий Е.А. Структура и функции эритроцитарных мембран / Е.А. Черницкий, А.В. Воробей. - Минск, 1981. – 204 с.
207. Чернов Ю. Н. Патологические изменения клеточных мембран при ишемической болезни сердца и возможные пути фармакологической коррекции / Ю. Н. Чернов, М. В. Васин, Г. А. Батищева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1992. – Т.57, №4. – С.67 – 72.
208. Чиркин А.А. Диагностический справочник терапевта / А. А. Чиркин, А. Н. Огороков, И. И. Гончарик. – Минск «Беларусь», 1993. – 106 с.
209. Шабанов П. Д. Наркомании: патопсихология, клиника, реабилитация / П. Д. Шабанов, О. Ю. Штакельберг; Под ред. А. Я. Гриненко. Серия “Мир медицины” – СПб.: Издательство “Лань“, 2000. – 368 с.
210. Элерте Д.Л. Биологические мембраны и патология клетки / Д. Л. Элерте, А. Я. Майоре. – Рига, 1986. – С. 62 – 70.
211. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме / А.А. Ярилин // Патологическая физиология. – 1998. - № 2. – С. 38-48.
212. Яровая Г. А. Калликреин-кининовая система и ингибитор протеолиза плазмы крови при различных нефропатиях у детей / Г. А. Яровая, Н. А. Коровина, М. П. Магомедов // Вопросы медицинской химии. – 1994. - №3. – С. 16 – 18.
213. Alesenko A. Neutral sphingomyelinase: localization in rat liver nuclei and involvement in regeneration/proliferation / A. Alessenko, S. Chatterjee // Mol. Cell Biochem. – 1995. – Vol.143, № 2. – P. 169-174.
214. Anemia in copper-deficient rats: role of alternations in erythrocyte membrane fluidity and oxidative damage / E. Roch., E. Gueux., A. Mazur et al. // Am J Physiol. – 1995. – Vol. 269. – P. 1245-1249.

215. Anokhina I. P., Panchenko L. F., Kogan B. M., Brusov O. S. // Alcohol Nutrition and the Nervous Systems. Progress in Alcohol Research. – The Netherlands. – 1985. – V. 1. – P. 127 – 145.
216. Becrer E.L. Leucocyte chemotaxis: methods, physiological and clinical disorders / E. L. Becrer E, H. J. Showell, P.H. Nacache.- N. Y.; L., 1978. P.113.
217. Bersohn M.M. Lysophosphatidylcholine and sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemma: comparison with ischemia / M.M. Bersohn, K.D. Philipson, R.S. Weiss // Am. J. Physiol. – 1991. – Vol. 260, № 3. – P. 433-438.
218. Breit S. N., Robinson J.P., Penny R. // J. Clin. and Lab. Immunol. 1983.- V. 10. - №3. - P. 147.
219. Chatterjee S. Neutral sphingomyelinase / S. Chatterjee // Adv Lipid Res. – 1993. – Vol. 26. – P. 25-48.
220. Dilberto E. J. Mechanism β - hydroxylation semidehydroascorbate as the enzymic oxidation product of ascorbate / E. J. Dilberto, P. L. Allen P // J. Biol. Chem. - 1981. – V. 256, №7. – P. 3385 – 3387.
221. Dousset N. Proprietes physico-chimiques des lipoproteines de tres basse densite oxydees / N. Dousset, M. Taus //C. r. seances Soc.biol.-1994.-Vol. 188,№5-6.-P.625.
222. Dyatlovitskaya E.V. Glycosphingolipids and antitumor immunity / E.V. Dyatlovitskaya, L.D. Bergelson // Biochim. Biophys. Acta. – 1987. – Vol. 907. – P. 125-143.
223. Enzymatic determination of phosphatidylcholine, sphingomyelin and phosphatidylglycerol in lipid dispersions, blood cell membranes and rat pulmonary surfactant / J.A. Encinar, M.D. Ludeca, M. Llanillo // Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. – 1996. – Vol. 34, № 1. – P. 9-15.
224. Exton J.H. Signaling through phosphatidylcholine breakdown / J.H. Exton // J. Biol. Chem. – 1990. - Vol. 265. – P. 1-4.
225. Grosz H. J. Propranolon in the treatment of heroin dependence // Skandia Int. Symp. Drug dependence, treatment and treatment evaluation. Stockholm: Bastrum, 1974.- P. 17 –33.

226. Hakomori S. Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions / S. Hakomori // *J. Biol. Chem.*. – 1990. – Vol. 265. – P. 18713-18716.
227. Hakomori S. Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling / S. Hakomori, Y. Igarashi // *J. Biochem.* – 1995. – Vol.118. – P. 1091-1103.
228. Hakomori S. Structure and function of sphingoglycolipids in transmembrane signalling and cell-cell interactions / S. Hakomori, Y. Igarashi // *Adv. Lipid Res.* – 1993. – Vol. 25. – P. 147-162.
229. Hanahan D.J. Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride / D.J. Hanahan // *Ann. Rev. Biochem.* – 1986. – Vol. 50. – P.483-509.
230. Hannun Y.A. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress / Y.A. Hannun // *Science.* – 1996. – Vol. 274. – P. 1855-1859.
231. Harrison K.A. Isoleukotrienes are biologically active free radical products of lipid peroxidation / K.A. Harrison, R.C. Murphy // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 17273-17278.
232. Hostetler K. X., Yazaki P. J. // *J. Lipid. Res.* 1979. V.20. P. 456-463.
233. Janero David R. Therapeutic potential of vitamin E in the pathogenesis of spontaneous atherosclerosis / R. Janero David // *Free Raic. Biol. and Med.*-1991.- Vol.11,№1.-P. 129-144.
234. Jayadev S. Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor / S. Jayadev, C.M. Linardic, Y.A. Hannun // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 757-763.
235. Korn E.D. Structure of biological membrane / E.D. Korn // *Science.*-1966-V.153.-P.1491-1498.
236. Laine V. J., Nyman K. M., Peuravuori H. J. et al. // *Gut.* – 1996. – Vol. 38. - №5. – P. 747 – 752.
237. Liscovitch M. Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases / M. Liscovitch // *TIBS.* – 1992. – Vol.17. – P. 393-399.

238. Liscovitch M. Lipid second messengers / M. Liscovitch, L.C. Cantley // *Cell*. – 1994. – Vol. 77. – P. 329-334.
239. Morrow J.D. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research / J.D. Morrow, L.J. Roberts II // *Biochem. Pharmacol.* – 1996. – Vol. 51. – P. 1-9.
240. Nagai Y. Functional roles of gangliosides in bio-signaling / Y. Nagai // *Behav. Brain Res.* – 1995. – V. 66. – P. 99-104.
241. Neil Kaplowitz Cell death at the millenium / Kaplowitz Neil // *Clinics in liver Disiase.* – 2000. – Vol. 4, № 2. – P. 211-224.
242. Neitcheva T. Phospholipid composition, phospholipase A2 and sphingomyelinase activities in rat liver nuclear membrane and matrix / T. Neitcheva, D. Peeva // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 1995. – Vol. 27, № 10. – P. 995-1001.
243. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C / Y. Nishizuka // *Science.* – 1992. – Vol. 258. – P. 607-614.
244. Secreted and intracellular phospholipases A2 inhibition by 1-decyl 2-octyl-glycerophosphocholine in rat peritoneal macrophages / P. Boucrot, B. Dubigeon C, L. Elkihel et al. // *Fundam. Clin. Pharmacol.* - 1998. - Vol. 12, № 4. – P. 433-441.
245. Secretory phospholipase A2 and lipoprotein lipase enhance 15-lipoxygenase-induced enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in low-density lipoproteins / J. Neuzil, J.M. Upston, P.K. Witting et al. // *Biochemistry.* – 1998. – Vol. 37, № 25. – P. 9203-9210.
246. Shayman J.A. Sphingolipids: Their Role in Intracellular Signaling and Renal Growth / J.A. Shayman // *Clinics in liver Disiase.* – 1999. – Vol. 3, № 2. – P. 306-313.
247. Spiegel S. Signal transduction through lipid second messengers / S. Spiegel, D. Foster, R. Kolesnick // *Curr. Opinion Cell Biol.* – 1996. - № 8. – P. 159-167.
248. Tushar Patel B. Apoptosis in hepatic pathophysiology / Patel B. Tushar // *Clinics in liver Disiase.* – 1999. – Vol. 3, № 2. – P. 374-384.

249. Whatmore J.L. Phospholipid asymmetry in plasma membrane vesicles derived from BHK cells / J.L. Whatmore, D. Allan // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – Vol. 1192, № 1. – P. 88-94.
250. Wilkins G. Tumor necrosis factor-alpha, sphingosine, ceramide: Which is the appropriate marker of inflammation? / G. Wilkins // *Journal of Pediatrics.* – 2000. – Vol. 136, № 5. – P. 521-528.
251. Wise N. A. // *The Neurobiology of Opiate-Reward Processes.* – P.405.