

На правах рукописи

Шарыпова Наталья Гавриловна

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

14.00.16 – патологическая физиология
14.00.45 - наркология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск 2004

Работа выполнена в ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Серебров Владимир Юрьевич

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор Балашов Петр Прокопьевич

Официальные оппоненты:

академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор
Дыгай Александр Михайлович

кандидат медицинских наук, Аболонин Алексей Федорович

Ведущая организация: ГУ НИИ общей патологии и патологической физиологии
РАМН (г. Москва)

Защита состоится « ____ » _____ 2004 г. в ____ часов на заседании
диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном
медицинском университете по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно – медицинской библиотеке
Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск,
пр.Ленина, 107)

Автореферат разослан « ____ » _____ 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета:

Суханова Г.А

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Распространенность заболевания наркоманией в нашей стране не имеет тенденции к снижению. Показатель заболеваемости наркоманией уже приближается к показателю заболеваемости сердечно-сосудистыми заболеваниями [Мандель А. И. и соавт.,1997]. В настоящее время употребление “чистых” наркотиков встречается чрезвычайно редко. Чаще всего, применяемые наркотические вещества представляют собой кустарно приготовленную смесь из наркотических, балластных, психотропных и часто просто токсических веществ. В процессе приготовления наркотика дополнительно привносятся вещества (органические растворители, ангидриды, окислители), обладающие собственным токсическим действием. Использование такой смеси ведет к общему отравлению. Стало очевидным, что употребление психоактивных веществ ведет не только к развитию личностных и психических аномалий, но и является причиной широкого круга соматических заболеваний [Аболонин А. Ф.,2001].

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 [Шабанов П. Д., Штакельберг О. Ю., 2000]. 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 [Иванец Н. Н. и соавт.,1997]. Не вызывает сомнения наличия у больных наркоманиями, прежде всего опийной группы, признаков вторичного иммунодефицита, повышающего риск возникновения у них инфекционных заболеваний и новообразований [Гамалея Н. Б.,1990]. Уровень дискоординации иммунологических процессов отражает тяжесть течения заболевания, позволяя дать прогноз в отношении осложнений и отдаленных последствий [Ледванова Т. Ю и соавт., 1998]. 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 [Нагорнев В.А.,1996]. Хорошо известно, что липиды клеточных мембран являются не только формой депонирования метаболического топлива и основной структурной компонентой клеточных мембран, но и системой биологических эффекторов, регуляторов и медиаторов, участвующих практически во всех физиологических процессах клетки [Финдлей Дж., Эванс С.,1991]. 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 [Алесенко А. В.,1998].

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 [Владимиров Ю.А., 1989; Локшина Л. А., 1994].

Течение и выраженность абстинентного синдрома при наркомании в значительной степени определяет характер лечения и прогноз заболевания. Существует несколько подходов к лечению абстинентного синдрома [Мандель А. И, Бохан Н. А., 1999]. Но анализ литературных 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. Известно, что опиная абстиненция протекает на фоне адренергического возбуждения [Иванец Н. Н. и соавт., 1997]. Избыток катехоламинов в крови может приводить к активации перекисного окисления липидов, активации фосфолипаз, 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 [Меерсон Ф. З., 1984]. Соответственно средствами патогенетической терапии могут являться препараты с β -адреноблокирующим действием. Исследование влияния β -адреноблокаторов на липидный спектр плазматических мембран лимфоцитов и механизмы, принимающие участие в его регуляции (перекисное окисление липидов, активность фосфолипаз и активность протеолитических ферментов), безусловно, будут способствовать пониманию патогенеза опиной наркомании, возможности прогнозирования исходов и определения тактики лечения данной патологии.

Цель работы:

Изучить механизмы структурных и функциональных нарушений плазматических мембран лимфоцитов крови у больных опиной 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 опиной 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 опиной 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 опиной 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 опиной 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 плазматических мембран лимфоцитов и их взаимоотношение с основными механизмами повреждения липидов клетки. В результате выполненного исследования были получены новые данные фундаментального характера о структурных 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, 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 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 в состоянии абстинентного синдрома 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 восстановления 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 опийной

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, на четвертом и пятом конгрессах молодых ученых и специалистов (Томск 2003, 2004)

Публикации: По теме диссертации опубликовано 9 работ, из них 3 статьи в центральной печати.

Объем и структура диссертации: Диссертация состоит из введения, трех глав, 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу работы положены результаты обследования 100 человек, которые были разделены по четырем группам. 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 2003 года. Исследовали лимфоциты, сыворотку и плазму.

Во всех случаях опийной абстиненции отмечалась выраженная клиническая картина, сопровождавшаяся целым рядом биохимических расстройств. По данным историй болезни при поступлении нарушения 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). Стандартная медикаментозная терапия опийной абстиненции проводилась в соответствии со стандартами лечения наркоманий и включала в себя использование клофелина, нейролептиков, седативных средств.

Метод выделения лимфоцитов периферической крови и получения плазматических мембран

Лимфоциты получали по методу [Натвина Д. и соавт., 1980]. Принцип метода основан на разделении клеток крови по плотности в градиенте “HISTORAQUE” - 1077 (производства “SIGMA DIAGNOSTICS”). Плазматические мембраны лимфоцитов получали по методу [Финдлей Дж., 1991].

Метод разделения липидов плазматических мембран лимфоцитов

Разделение основных классов фосфолипидов (ФЛ) и нейтральных липидов проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) по методу [Жухоровой Л. С., 1984]. Получали следующие фракции ФЛ: лизофосфолипиды (ЛФЛ), сфингомиелин (СФМ), фосфатидилинозитол (ФИ), суммарная фракция фосфатидилхолина и фосфатидилсерина (ФХ+ФС), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), церамиды. Церамиды разделяли путем двукратной прогонки в разных системах растворителей. Модификацию мембранных ФЛ проводили по методу [Финдлей Дж., 1991] с помощью тринитробензолсульфоновой кислоты.

При разделении нейтральных липидов получали следующие фракции: фосфолипиды (ФЛ), холестерол (ХС) и эфиры холестерина (ЭХ). Разделение проводили на пластинках для ТСХ “SORBFIL”(Россия). Хроматограммы проявляли с помощью фосфорномолибденовой кислоты с последующим элюированием каждой фракции и определением неорганического фосфата по методу Боданского [Колб В. Г., 1982].

Методы определения активности липолитических ферментов

Активность сфингомиелиназы, фосфолипазы A_2 (ФЛ A_2), фосфолипазы D (ФЛ D) определяли по методу [Брокерхофа Х., 1978]. Активность сфингомиелиназы определяли по уменьшению концентрации сфингомиелина (“ICN Biomedical”). Выделение сфингомиелина проводили методом ТСХ и концентрацию выражали в мМоль фосфора. Активность ФЛ A_2 определяли по увеличению содержания ЛФЛ, выделение и анализ которых проводили методом ТСХ. Активность ФЛ D определяли по количеству фосфатидной кислоты, выделение и анализ которой проводили в двухфазной системе ТСХ.

Методы оценки активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активности антиокислительных ферментов

Определение содержания ТБК – активных продуктов в лимфоцитах и сыворотке крови осуществляли в реакции с тиобарбитуровой кислотой по методу [Каган В. Е., 1986]. Активность каталазы в лимфоцитах и сыворотке крови определяли по методу [Королюк М. А., 1988]. Определение активности супероксиддисмутазы в лимфоцитах и сыворотки крови проводили по методу [Каган В. Е., 1986].

Методы определения активности протеолитических процессов

Определение активности трипсина в сыворотке крови проводили по методу [Пасхина Т. С., 1988] с использованием синтетического субстрата БАПНА (N-бензоил-L-аргинина-p-нитроанилид) Активность трипсина выражали в МЕ/мл. Определение содержания плазминогена в плазме крови проводили по методу [Баркаган З. С., 1999]. Содержание растворимых фибринмономерных комплексов (РФМК) в плазме крови определяли по методу [Момот А. П., 1996]. Активность α_1 – протеиназного ингибитора (α_1 –ПИ) и α_2 – макроглобулина (α_2 – МГ) в плазме крови определяли унифицированным спектрофотометрическим методом по торможению гидролиза N-бензоил- L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ) и выражали в условных ингибиторных единицах (ИЕ/мл). Активность антитромбина – III (АТ – III) в плазме крови определяли по методу [Баркаган З. С., 1999]. Активность фактора Виллебранда (ФВ) в плазме крови определяли по методу [Баркаган З. С., 1999] на агрегометре Биола (модель LA 230).

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 $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили с помощью вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена [Лакин Г.Ф., 1980].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Биологическим мембранам принадлежит ключевая роль в обеспечении и регуляции физиологической активности клеток [Геннис Р., 1997]. 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 [Владимиров Ю.А., 1989]. С этих позиций нами было проведено исследование липидного спектра плазматических мембран (ПМ) лимфоцитов, особенности, изменения которых в определенной степени отражают характер структурной перестройки в иных мембранных системах [Черницкий Е.А., Воробей А.В., 1981]. Результаты изучения липидного состава плазматических мембран (ПМ) лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до проведения лечения, на стандартном лечении и лечении в комплексе с β -АБ представлены на рисунке 1.

Проведенный анализ показал, что в ПМ лимфоцитов содержание ХС по сравнению с аналогичным показателем группы контроля было достоверно выше в 2,6 раза ($p < 0,05$) у больных группы 1 (до начала лечения), в 2,2 раза ($p < 0,05$) у больных группы 2 (на стандартном лечении) и в 1,6 раза ($p < 0,05$) у больных группы 3 (на комплексном лечении) 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 доноров достоверно превышало в 2,2 раз ($p < 0,05$) аналогичный показатель у больных группы 1, в 1,7 раз ($p < 0,05$) у больных группы 2 и в 1,2 раза ($p < 0,05$) у больных группы 3 соответственно. 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 больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения содержание ЛФЛ в ПМ лимфоцитов 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 достоверно повышен в 7 раз ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем группы контроля. Было выявлено достоверное различие в содержании ЛФЛ у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3. Содержание СФМ в ПМ лимфоцитов было достоверно выше у больных группы 1 и группы 2 в 1,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы. 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. Уровень ФИ в первой, второй и третьей группе больных в ПМ лимфоцитов достоверно не отличался от аналогичного показателя в

группе контроля. В группе 1 (до начала лечения) содержание суммарной фракции ФХ+ФС в ПМ лимфоцитов 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 было достоверно снижено в группе 1 в 1,5 раза ($p < 0,05$), в группе 2 в 1,3 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с аналогичный показатель группы контроля. 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 был достоверно ниже в группе 1 в 3,2 раза ($p < 0,05$), в группе 2 в 2,8 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с аналогичный показатель группы контроля. В группе 3 содержание церамидов достоверно не отличалось от аналогичного показателя в контрольной группе. Было выявлено достоверное различие в содержании церамидов в ПМ лимфоцитов у больных опийной наркоманией группы 2 (на стандартном лечении) и группы 3 (на комплексном лечении).

Результаты изучения отношения ХС/ФЛ в ПМ лимфоцитов представлены на рисунке 2. Отношение ХС/ФЛ в группе здоровых лиц 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 показателя 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 на рисунке 2. 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 контрольной группе. Было выявлено достоверное различие показателя мФЭА/оФЭА в ПМ лимфоцитов у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Накопление ХС чревато увеличением микровязкости бислоя, изменением латеральной диффузии рецепторов, нарушением ионного транспорта, что делает мембрану лимфоцитов менее приспособленной к выполнению своих функций [Каплан О.В., 1995]. Выявленное обогащение мембран лимфоцитов ХС может явиться следствием активации перекисного окисления липидов, поскольку свободный ХС, выступая в роли антиоксиданта, способен ингибировать пероксидацию структурированных липидов [Зуева О.М. и соавт., 1989]. Повышение отношения ХС/ФЛ в лимфоцитах крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции связано с накоплением ХС в мембранах клеток и указывает на ограничение подвижности лимфоцитов крови.

Являясь важным структурным компонентом плазматических мембран, ФЛ регулируют активный и пассивный трансмембранный транспорт веществ, определяют чувствительность клеток к действию лигандов, детерминируют активность мембраносвязанных ферментных систем, участвуют в процессах свертывания крови [Агеева Т.С., 1994]. В связи с этим, поддержание соотношения между фракциями фосфолипидов на физиологическом уровне является непременным условием нормального функционирования клеток.

Проведенный нами анализ фосфолипидного спектра плазматических мембран лимфоцитов у больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного

синдрома до лечения и на стандартном лечении, показал отчетливое снижение уровня легкоокисляемой фракции ФЭА, что может привести к нарушению внутриклеточного ионного гомеостаза. Кроме того, закономерным результатом уменьшения уровня ФЭА, богатого полиненасыщенными жирными кислотами, является снижение антиокислительной активности липидов мембран лимфоцитов, что приводит к нарушению стационарного уровня перекисного окисления липидов. Повышенное содержание ФХ увеличивает поступление Ca^{2+} в клетки, что приводит к активации ФЛ A_2 и освобождению арахидоновой кислоты из ФХ.

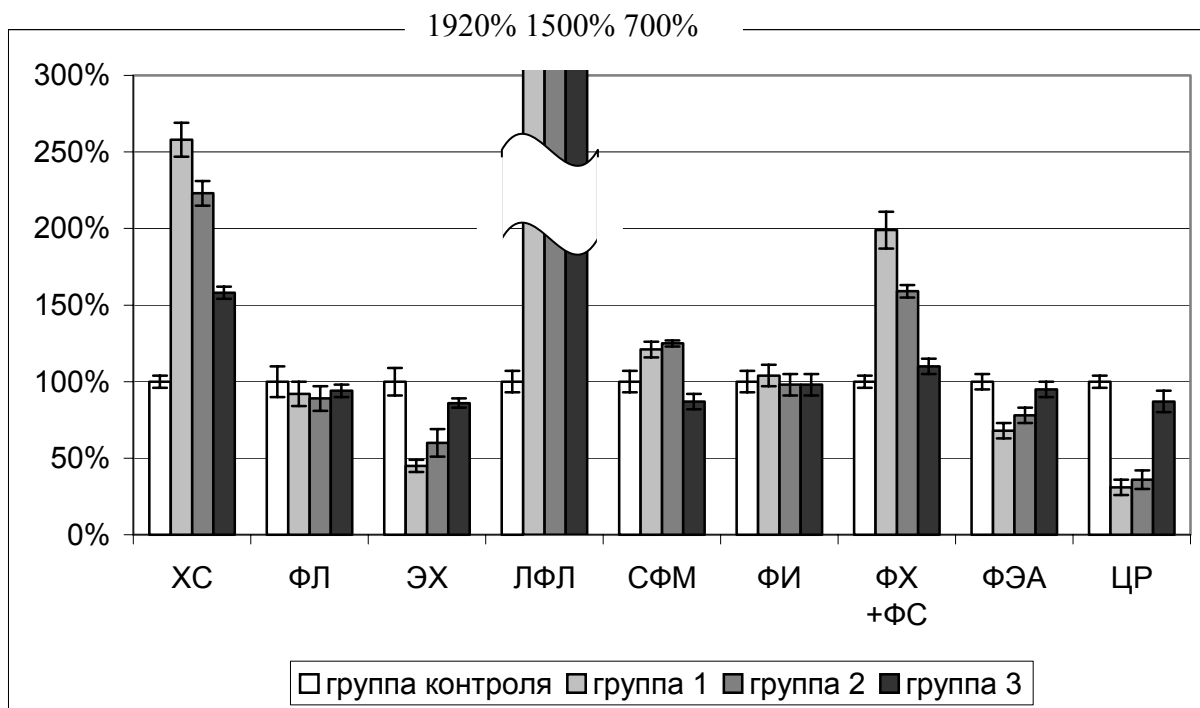


Рис. 1. Отдельные фракции липидов в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и лечения в комплексе с обзиданом (группа 3) (в % к контролю)

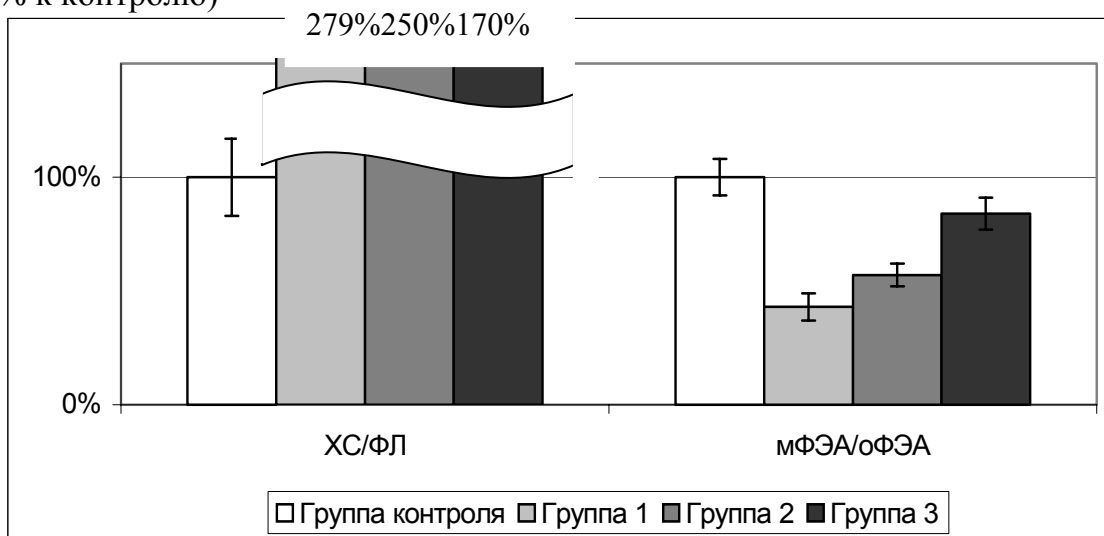


Рис.2. Отношение холестерина к фосфолипидам (ХС/ФЛ) и показатель трансмембранной асимметрии (мФЭА/оФЭА) в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и лечения в комплексе с обзиданом (группа 3) (в % к контролю)

Отмеченное нами накопление ЛФЛ в ПМ лимфоцитов больных всех трех групп чревато переходом липидного бислоя в монослой, активацией проницаемости мембраны для Na^+ и K^+ , солюбилизацией ферментов [Зелинский Б.А., Паламарчук А.В., 1994].

Биологические мембраны обладают функциональной асимметрией. В настоящее время установлено, что асимметрия отражается в различном распределении липидов и других компонентов мембраны между двумя поверхностями двойного липидного слоя. Показатель трансмембранной асимметрии (ТМА) ПМ является важной величиной, определяющей структурную организацию мембраны и, следовательно, функциональную способность клетки. Изменения ТМА, которое мы выявили в ПМ лимфоцитов больных первой и второй группы, проявляющиеся, в уменьшении соотношении мФЭА/оФЭА напрямую связаны с нарушениями в липидном обмене в целом и с нарушением распределения липидов в мембране в частности.

В результате выше изложенных нарушений мембрана клеток становится ригидной, нарушается 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. Нарастание 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 [Нелаева А.А., Кашуба Ю. И., 1990].

Положительное влияние β -АБ обзидана на липидный спектр плазматических мембран лимфоцитов больных третьей группы вероятно можно объяснить его стабилизирующим действием на плазматические мембраны лимфоцитов [Сысолятина Н. А., 1992].

Изучение активности сфингомиелиназы, содержания сфингомиелина и церамидов в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения, на стандартном лечении и лечении в комплексе с β - адреноблокатором

Полученные в ходе исследования данные об изменении активности сфингомиелиназы, а также содержания СФМ и церамидов в ПМ лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения, на стандартном лечении и лечении в комплексе с β - АБ представлены на рис. 3.

Проведенный анализ показал, что в ПМ лимфоцитов в группе больных опийной наркоманией до лечения (группа 1) обнаружено значительное увеличение активности сфингомиелиназы, её активность возросла в 2,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, на стандартном лечении (группа 2) обнаружено увеличение активности сфингомиелиназы в 2,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой здоровых доноров. В группе больных на комплексном лечении (группа 3) 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 опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

В наших исследованиях изучалась активность нейтральной сфингомиелиназы, мембраносвязанного и Mg^{2+} , Mn^{2+} зависимого фермента. Эту изоформу сфингомиелиназы содержат плазматическая и ядерная мембрана [Брокерхоф Х., 1978]. Известно, что именно нейтральная Mg^{2+} , Mn^{2+} - зависимая сфингомиелиназа воздействует на особый “сигнальный” трансдукционный пул сфингомиелина [Neitcheva T., 1995], включенный в процессы регулирования жизненной программы

клетки (избирательная активность генетического аппарата клетки, пролиферация и дифференцировка, апоптоз) [Neil Kaplowitz., 2000]. В ходе исследования было выявлено увеличение активности сфингомиелиназы в группе больных до лечения и в группе больных, находившихся на стандартном лечении, так и менее значительное увеличение в группе больных, находившихся на комплексном лечении (рис. 3).

Среди 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 [Ленинджер А., 1985]. Таким образом, концентрация сфингомиелина может оставаться повышенной при увеличенной активности сфингомиелиназы, если синтез сфингомиелина *de novo* преобладает над его деградацией под действием фермента. К факторам, косвенно свидетельствующим о преобладании синтеза сфингомиелина над его гидролизом, относятся снижение уровня церамидов (рис 3), которые являются субстратом для синтеза сфингомиелина *de novo*.

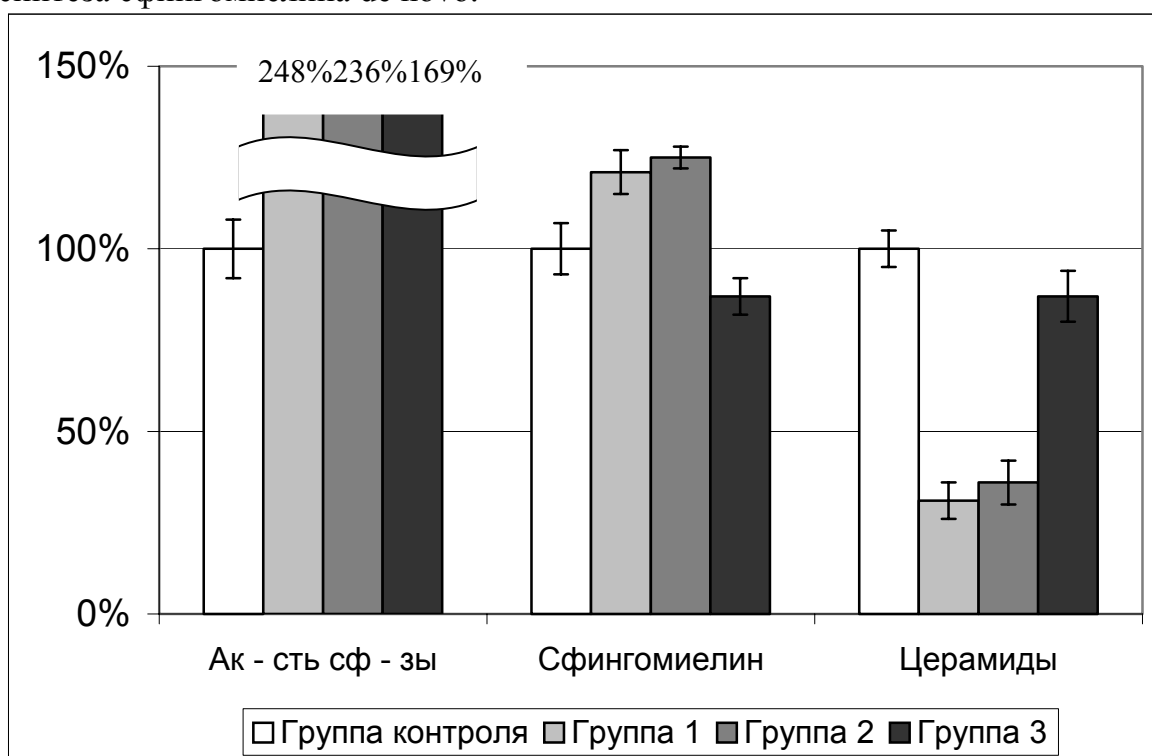


Рис. 3. Активность сфингомиелиназы, содержание сфингомиелина и церамидов в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и лечении в комплексе с обзиданом (группа 3) (в % к контролю)

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

Сфингомиелин и церамиды 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 [Жданов Р. И., 1999], вызывают ингибирование протеинкиназы С [Ткачук В. А., 1998] и экспрессии bcl-2 [Меджитов Р. М., 1991]. Также церамиды вызывают выход кальция [Nannun Y., 1996] и активацию нуклеаз, снижают активность ФЛ D и модулируют активность других фосфолипаз [Neitcheva T., 1995] и др. Данные эффекты лежат в основе антипролиферативного, противоопухолевого и других влияний церамидов [Дятловицкая Э. В., 1998]. В отличие от церамида сфингомиелин обладает противоположным эффектом на перечисленные внутриклеточные процессы. Выявленное повышение содержания сфингомиелина может приводить к активации ФЛ 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 церамидов.

Таким образом, обнаруженные изменения в обмене сфинголипидов у больных опийной наркоманией в период абстиненции могут привести 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 [Нелаева А.А., 1990].

Изучение активности фосфолипаз и процессов перекисного окисления липидов плазматических мембран лимфоцитов и сыворотки крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения, на стандартном лечении и лечении 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 [Губергриц Н. Б., Лукашевич Г. М., 2000]. Фосфолипазы являются инструментом, регулирующим быстрое изменение состава фосфолипидов. Известно, что фосфолипазы типа А играют важную роль в формировании уникального набора жирных кислот ФЛ мембран. Фосфолипаза А₂ (ФЛ А₂) является мишенью в клетках действия целого ряда гормонов. 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 [Бабенко Н. А., Кавок Н. С., 1994]. В том числе активация фосфолипаз может влиять на состав и количество жирных кислот, которые входят в состав биоэффекторных молекул сфинголипидов [Проказова Н. В., 1999]. Продукты действия фосфолипаз А₂ и D оказывают прямое действие на ключевой фермент сфингомиелинового цикла – сфингомиелиназу [Neitcheva T., 1995].

Изучение активности фосфолипаз показало (рис. 4), что в группе 1 (до начала лечения) обнаружено значительное увеличение активности ФЛ А₂, её активность возросла в 2,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем группы контроля. В группе больных опийной наркоманией на стандартном лечении (группа 2) обнаружено также значительное увеличение активности ФЛ А₂, её активность возросла в 1,8 раза ($p < 0,05$). В группе больных на комплексном лечении (группа 3) обнаружено менее значительное увеличение активности ФЛ А₂

в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем группы контроля. Аналогичные изменения мы обнаружили и при исследовании активности ФЛ D. В первой группе больных происходит 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 опишной наркоманией группы 2 и группы 3.

Активация фосфолипаз при опишной наркомании в состоянии абстиненции может реализоваться тремя путями. Во-первых, катехоламины, выход которых в кровь возрастает при абстинентном синдроме [Шабанов П. Д., Штакельберг О. Ю., 2000], активируют систему кинин-каллекреина и вызывают ряд явлений: фактор Хагемана → кининоген → брадикинин → активация фосфолипазы A.

Во-вторых, увеличение концентрации Ca²⁺ 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 [Меерсон Ф. З., 1984].

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 [Жижина Г. П., 1994], но и активация фосфолипаз A₂, C и D [Сала А., 1998]. Повышение активности фосфолипазы A₂ приводит к удалению токсичных перекисленных жирнокислотных остатков фосфолипидов из тканей. Продуктом гидролиза фосфолипидов ФЛ A₂ являются лизофосфолипиды – чрезвычайно цитотоксичные вещества [Губергриц Н. Б., 2000].

Как было показано выше (рис. 1), было выявлено значительное увеличение содержания ЛФЛ во всех трех группах больных. Включение ЛФЛ в липидный бислой меняет липидное окружение, а как следствие, активность ферментов, рецепторов и каналов ионной проводимости. Механизм повреждающих эффектов ЛФЛ связан с их способностью, разрывать структуру биологических мембран, создавая, таким образом, предпосылку для накопления в клетке Ca²⁺ [Меерсон Ф. З., 1984].

Вторым продуктом действия ФЛ A₂ является арахидоновая кислота (АК) [Губергриц Н. Б., 2000]. АК обладает ингибирующим влиянием на ФЛА₂ и оказывает стимулирующее действие на сфингомиелиназу [Брокерхоф Х., 1978]. Однако, в наших исследованиях мы обнаружили повышенную активность ФЛА₂. 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 отсутствии арахидоновой кислоты как основного ингибитора фосфолипазы A₂, активность её остаётся повышенной. Обнаруженное нами увеличение активности фосфолипазы D может служить причиной повышенной активности сфингомиелиназы, так как продукт действия фосфолипазы D – фосфатидная кислота является активатором сфингомиелиназы [Брокерхоф Х., 1978]. Активная ФЛ A₂ тесно взаимодействует с перекисным окислением липидов (ПОЛ). Это обусловлено тем, что продукты ПОЛ активируют ФЛ A₂. Активация ФЛ A₂ является мощным усилителем влияния ПОЛ на биологические мембраны [Губергриц Н. Б., 2000].

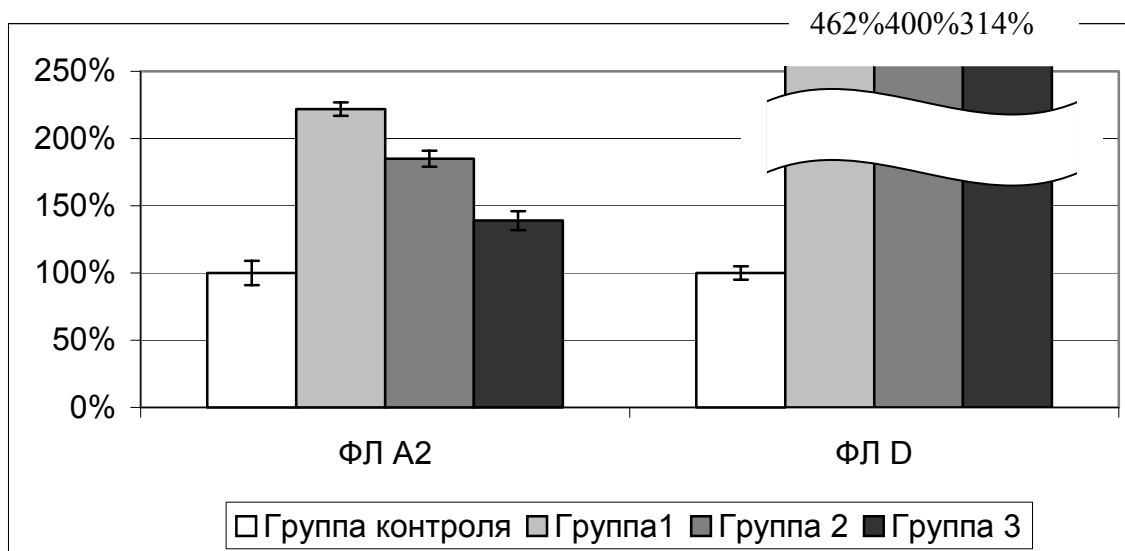


Рис. 4. Активность фосфолипазы A₂ и фосфолипазы D в плазматических мембранах лимфоцитов больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и в комплексе с обзиданом (группа 3) (в % к контролю)

В связи с этим, в нашей работе мы определили количество конечных продуктов ПОЛ: ТБК – активные продукты (ТБК – ап), а так же активность ферментов антиоксидантной защиты: каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в плазматических мембранах лимфоцитов и сыворотке крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения, на стандартном лечении и лечении в комплексе с β-АБ. Результаты представлены на рис 5.

В группе больных до лечения (группа 1) содержание ТБК – ап в ПМ 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 (группа 2), содержание ТБК – ап в ПМ лимфоцитов превышало аналогичный показатель в контрольной группе 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 (группа 3), было выявлено увеличение содержание ТБК – ап в ПМ лимфоцитов в 3,1 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля, в сыворотке изменение содержания ТБК – ап было недостоверно. Было выявлено достоверное различие в содержании ТБК – ап в ПМ лимфоцитов и сыворотке у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

В группе больных опийной наркоманией до начала лечения активность каталазы в лимфоцитах была ниже аналогичного показателя в группе контроля 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 лимфоцитах и сыворотке по сравнению с группой контроля было недостоверно. Было выявлено достоверное различие в активности каталазы в лимфоцитах и сыворотке у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

Активность СОД так же претерпевала аналогичные изменения. 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 контрольной группы, в сыворотке снижение составило в 2,7 раза ($p < 0,05$). В группе больных, находившихся на стандартном лечении, было выявлено снижение активности СОД в лимфоцитах в 2,4 раза ($p < 0,05$), в

сыворотке снижение составило в 1,8 раза ($p < 0,05$) по сравнению с аналогичным показателем группы контроля. 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 лимфоцитах у больных опийной наркоманией группы 2 и группы 3.

В организме человека ПОЛ имеет большое значение для обновления липидов мембран клеток и посредством этого поддержания структурного гомеостаза. Известно, что степень выраженности процессов перекисного окисления липидов определяется соотношением функциональной активности прооксидантных и антиоксидантных метаболических механизмов [Чекман И. С., 1996]. Исходя из этого, интенсификация ПОЛ может быть обусловлена увеличением активности прооксидантных систем, антиоксидантной недостаточностью и сочетанием этих двух факторов.

Полученные результаты позволяют сделать утверждение, что в условиях абстинентного синдрома при опийной наркомании разбалансированность процессов окислации - 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 существенный их выброс в кровотоки (вследствие деструкции мембран лизофосфолипидами) [Сайфутдинов Р.И., Коц А И 1990]

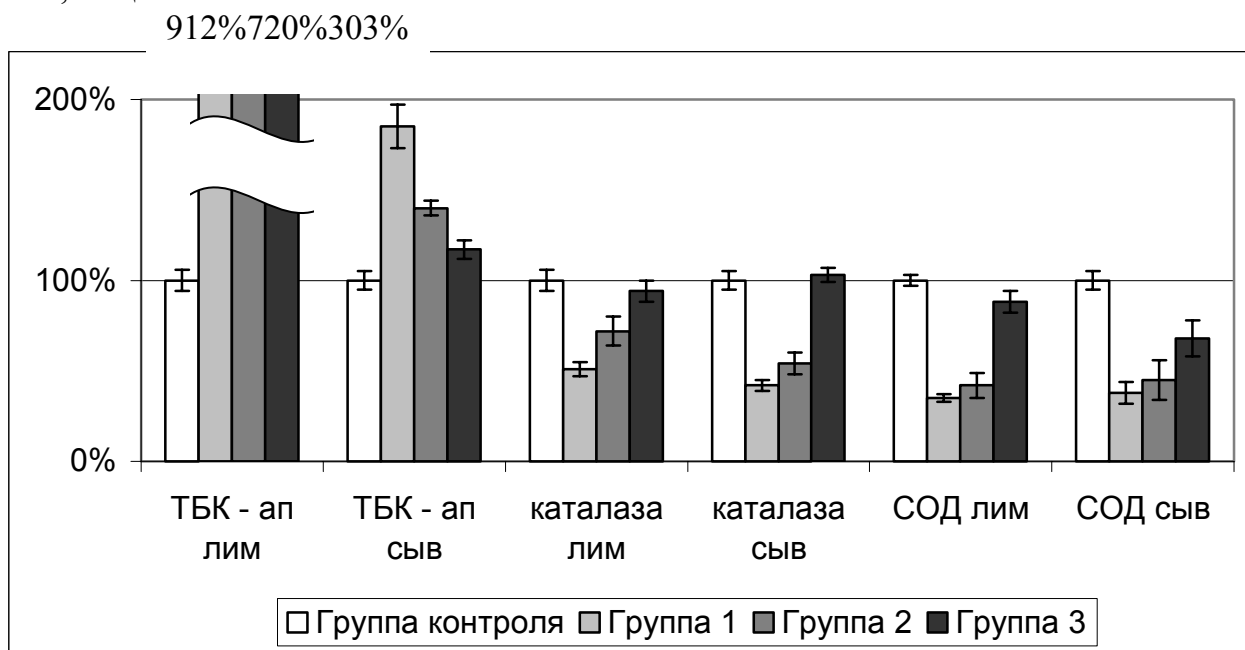


Рис. 5. Содержание ТБК – активных продуктов, активность каталазы и супероксиддисмутазы в плазматических мембранах лимфоцитов и сыворотке крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и лечении в комплексе с обзиданом (группа 3) (в % к контролю)

Уменьшение активности каталазы и СОД может происходить из-за длительного действия активных форм кислорода на клетку и как следствие истощения данных ферментов. 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 контроля. 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 [Меерсон Ф. З., 1984]. Ингибирование ПОЛ приводит к снижению активности фосфолипазы A_2 и ФЛ D [Меерсон Ф. З., 1984], которое мы наблюдали в группе больных, находившихся на комплексном лечении.

Изучение протеиназно-ингибиторной системы плазмы крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения, на стандартном лечении и лечении 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 [Яровая Г. А., 1994].

В нашей работе мы изучали активность трипсина и содержание плазминогена. Данные об активности трипсина и содержании плазминогена в плазме крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения, на стандартном лечении и лечении в комплексе с β -АБ представлены на рис.6.

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.

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.

Трипсин является общим активатором протеолитических систем крови. В норме трипсин в плазме крови существует в неактивном состоянии из-за образования комплекса с ингибиторами. Предшествующее воздействие на мембраны клеток протеолитических ферментов - трипсина и др. приводит к активации фосфолипаз, что вызывает полное разрушение холинсодержащих фосфолипидов. Увеличение активности трипсина запускающего протеиназы кининовой, фибринолитической и свертывающей систем, комплемента, очевидно, имеет решающее значение в развитии необратимых катаболических реакций организма. Превращение плазминогена в плазмин возможно под действием активаторов, которые высвобождаются из эндотелия под действием многочисленных эндогенных и экзогенных стимулов: ацидоза и гипоксии, некоторых вазоактивных медиаторов – гистамина, серотонина, брадикинина, катехоламина. Как уже упоминалось выше, в период абстинентного синдрома при опийной наркомании имеет место ускоренный синтез катехоламинов [Анохина И. П., 1995], что может приводить к высвобождению из эндотелия активатора плазминогена. Следовательно, снижение концентрации плазминогена у больных опийной наркоманией может означать не только активацию системы фибринолиза, но и гиперактивацию в кровотоке других протеолитических систем.

К протеолитическим ферментам относится и тромбин - ключевой фермент свертывающей системы крови, который участвует в регуляции многих физиологических процессов. Показателем наличия активного тромбина в плазме является наличие растворимых фибринмономерных комплексов (РФМК). Факт обнаружения РФМК имеет диагностическое значение, так как они являются

маркерами тромбинемии и внутрисосудистого свертывания крови, и их наличие свидетельствует о появлении активного тромбина в крови и о развитии гиперкоагуляции [Иванов Е. П., 1991]. Данные о содержании РФМК в плазме крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения, на стандартном лечении и лечении в комплексе с β -АБ представлены на рис. 6. В группе больных опийной наркоманией до начала лечения (группа 1) и в группе больных опийной 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 сравнения. 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.

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 [Проценко В. А., Шпак С. И., 1988].

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, на стандартном лечении и лечении в комплексе с β -АБ представлены на рис. 6.

Проведенный анализ показал, что 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 контроля. 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 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.

В группе больных опийной наркоманией до проведения лечения (группа 1) и, находившихся на стандартном лечении (группа 2), активность АТ III была снижена 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.

АТ III относят к ингибиторам тромбина и слабым ингибитором плазмина; α_1 – ПИ, снижает активность тромбина, трипсина и плазмина; α_2 – МГ слабый ингибитор тромбина, плазмина, калликреина и трипсина. 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 (ФВ) в плазме крови. Данные об активности ФВ в плазме крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения, на стандартном лечении и лечении в комплексе с β -АБ представлены в таблице 1. Проведенный анализ показал, что в группе больных до проведения терапии (группа 1) и, находившихся на стандартном лечении (группа 2), активность ФВ была достоверно повышена 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.

Таблица 1

Активность фактора Виллебранда (%) плазмы крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и лечения в комплексе с обзиданом (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 \pm 3,7	136,7 \pm 6,8*	132,7 \pm 4,0*	128,4 \pm 6,6*

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

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. Фибринолитическая система может активироваться до такой степени, что содержание ингибиторов плазмينا может исчерпываться. Содержание АТ III, α_2 – МГ снижается при потреблении этих факторов в результате увеличения активности протеолитических ферментов. При появлении в крови активного тромбина и растворимого фибрина активируется АТ- III, количество которого быстро падает из-за необходимости нейтрализации тромбина [Иванов Е. П., 1991].

Таким образом, снижение АТ III и α_2 – МГ в плазме крови больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома обусловлено увеличением активности протеолитических ферментов, и появления в крови активного тромбина. 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.

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. 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). Фармакологическое выключение β -адренорецепторов является препятствием к появлению характерного для β -адреностимуляции влияния на активность лизосомальных ферментов и стабильность лизосомальных мембран [Сысолятина Н. А., 1992]. Комплексообразование β -адренергических средств с β -адренорецепторами (в том числе и на лизосомах) препятствует действию избытка катехоламинов, свойственного абстинентному синдрому при опийной наркомании.

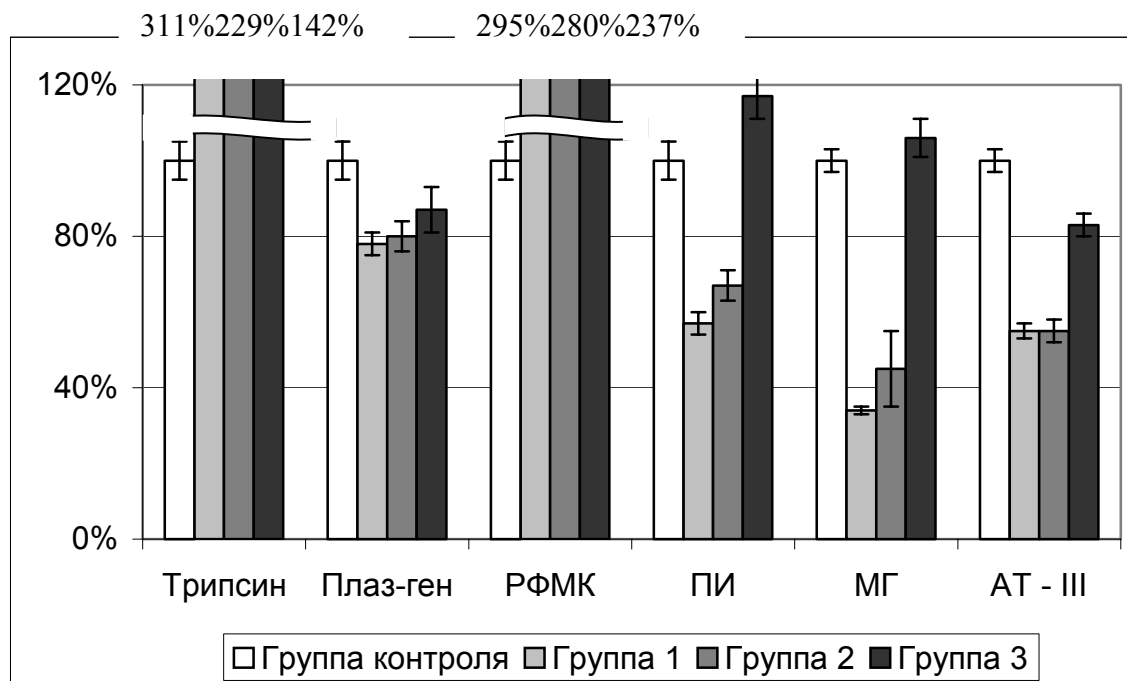


Рис.6. Активность трипсина, α_1 –протеиназного ингибитора, α_2 –макроглобулина, антитромбина-III, содержание плазминогена, растворимых фибринмономерных комплексов в сыворотке и плазме крови больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции до лечения (группа 1), на стандартном лечении (группа 2) и в комплексе с обзиданом (группа 3) (в % к контролю)

Таким образом, у больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома наступает ряд изменений в липидном составе мембран лимфоцитов крови, проявляющиеся в увеличении содержания холестерина, лизофосфолипидов, фосфатидилхолина и фосфатидилсерина и уменьшении содержания фосфатидилэтаноламина, эфиров холестерина; нарушении обмена сфинголипидов (которые проявляются в увеличении содержания сфингомиелина, в увеличении активности сфингомиелиназы и уменьшении содержания церамидов); изменением трансмембранной асимметрии распределения фосфатидилэтаноламина и отношения холестерина к фосфолипидам. Все это может привести к дисбалансу в липидном обмене мембран лимфоцитов, и как следствие к нарушению функционирования липидзависимых ферментов, рецепторов и каналов ионной проницаемости. В механизмах повреждения мембран у больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома активное участие принимают изменение активности протеолитических ферментов и их ингибиторов, фосфолипаз (A_2 , D) и процесса ПОЛ.

Вероятно, целенаправленная коррекция выше названных изменений может изменить течение абстинентного синдрома при опийной наркомании.

Обусловленная избытком катехоламинов, ускоренный синтез которых происходит в состоянии абстиненции, активация липаз, фосфолипаз, ПОЛ, достигая чрезмерного уровня, приводит к повреждению липидного бислоя мембран и, как следствие, к нарушению функционирования рецепторов и каналов ионной проницаемости, липидзависимых ферментов [Меерсон Ф. З., 1984]. Эти изменения можно в значительной степени предупредить введением β – адреноблокаторов. 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+} . При значительном и длительном избытке эндогенных катехоламинов механизмы самоограничения адренергического эффекта могут быть сорваны [Меерсон Ф. З., 1984].

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

В основе положительного влияния обзидана на липидный спектр и обмен сфинголипидов плазматических мембран лимфоцитов больных опийной наркоманией, находившихся в состоянии абстинентного синдрома, лежит снижение активности фосфолипаз, угнетение процессов перекисного окисления липидов и восстановление баланса протеиназно-ингибиторной системы.

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 работ, опубликованных по теме диссертации

1. Активность фосфолипаз плазматических мембран лимфоцитов у больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции // Сборник статей молодых ученых и специалистов “Четвертый конгресс молодых ученых и специалистов” (Томск, 2003 г.) - С. 186.;
2. Изучение состава липидов плазматических мембран лимфоцитов у больных опийной наркоманией в состоянии абстиненции // Актуальные проблемы медицины и биологии. – 2003. - №2. - С 41-42. (в соавт. с Серебровым В. Ю., Балашовым П. П.);
3. Компоненты сфингомиелинового цикла в плазматических мембранах лимфоцитов при абстинентном синдроме у больных опийной наркоманией // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2004. - № 1. – С. 12-13. (в соавт. с Серебровым В. Ю., Балашовым П. П.);
4. Перекисное окисление и спектр липидов плазматических мембран лимфоцитов при абстинентном синдроме у больных опийной наркоманией // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2004. - № 2. – С. 43-45. (в соавт. с Серебровым В. Ю., Балашовым П. П.);
5. Исследование активности фосфолипаз плазматических мембран лимфоцитов при абстинентном синдроме у больных опийной наркоманией // Актуальные проблемы медицины и биологии. – 2004. – Т. 3. - №1. – С. 89. (в соавт. с Серебровым В. Ю., Балашовым П. П.);
6. Характеристика перекисного окисления липидов плазматических мембран лимфоцитов при абстинентном синдроме у больных опийной наркоманией // Актуальные проблемы медицины и биологии. – 2004. – Т. 3. - №1. – С. 90. (в соавт. с Серебровым В. Ю., Балашовым П. П.);
7. Влияние состояния абстиненции на соотношение компонентов сфингомиелинового цикла в плазматических мембранах лимфоцитов у больных опийной наркоманией // Актуальные проблемы медицины и биологии. – 2004. – Т. 3. - №1. – С. 91. (в соавт. с Серебровым В. Ю., Балашовым П. П.);
8. Спектр липидов плазматических мембран лимфоцитов при абстинентном синдроме у больных опийной наркоманией // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. - №4. – С. 10 – 12. (в соавт. с Серебровым В. Ю., Балашовым П. П.);
9. Дисбаланс протеиназно – ингибиторной системы у больных опийной наркоманией в состоянии абстинентного синдрома // Сборник статей молодых ученых и специалистов “Пятый конгресс молодых ученых и специалистов” (Томск, 2004 г.) - С. 201-202.;

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

α_1 – ПИ - α_1 – протеиназный ингибитор
 α_2 – МГ – α_2 – макроглобулин
 β – АБ – β – адреноблокаторы
АТ -III – антитромбин III
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
ФВ – фактор Виллебранда
ФИ - фосфатидилинозитол
ФЛ - фосфолипиды
ФЛА₂ – фосфолипаза А₂
ФЛD – фосфолипаза D
ФНО – фактор некроза опухоли
ФС - фосфатидилсерин
ФХ - фосфатидилхолин
ФЭА – фосфатидилэтаноламин
мФЭА – модифицированный фосфатидилэтаноламин
оФЭА – общий фосфатидилэтаноламин
ХС - холестерин
ЭХ - эфиры холестерина