

На правах рукописи

НОВИЦКИЙ
Сергей Викторович

**РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ СФИНГОМИЕЛИНОВОГО ЦИКЛА
В МЕХАНИЗМАХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПЕЧЕНИ У
БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ**

14.00.16 – патологическая физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск 2002

Работа выполнена в Сибирском государственном медицинском университете

Научный руководитель:

доктор мед. наук, профессор

Серебров Владимир Юрьевич

Официальные оппоненты:

член-корреспондент РАМН, доктор мед. наук, профессор Дыгай Александр Михайлович

кандидат мед. наук Кондакова Ирина Викторовна

Ведущая организация: Новосибирская государственная медицинская академия (г. Новосибирск)

Защита состоится «___» _____ 2002 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 206.096.01 в 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 « 21 » сентября 2002 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

Бражникова Н.А

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Вирусный гепатит является широко распространенной патологией, приводящей к развитию серьезных осложнений (цирроз, рак печени), а нередко и к преждевременной смерти. Данные ВОЗ [<http://www.who.int>] показывают заметный рост заболеваемости вирусным гепатитом в мире, рост числа летальных исходов этого заболевания и отсутствие эффективных методов лечения. В связи с этим разработка мер профилактики и лечения вирусных гепатитов является актуальной проблемой современной медицины [Алейник М.Д. и др, 2000; Виноградова Е.Н., 1996; Гулямов М.Г., 1992; Соринсон С.Н., 1996; Cornberg M., 2001].

В настоящее время продолжает оставаться неясным вопрос, почему в одних случаях заболевание эффективно купируется проводимым лечением и протекает по классической схеме «болезнь – лечение – выздоровление», а в других осложняется массивным некрозом паренхимы печени или варьирует от кажущегося благополучным длительного совместного существования вируса и клетки до развития хронических заболеваний печени и возникновения рака [Апросина З.Г., 1981; Гольдберг Е.З., 1992; Гулямов М.Г., 1992; Жданов В.М., 1986; Соринсон С.Н., 1996; Cardonolla L., 2002]. Своевременный и точный прогноз заболевания позволяет выбрать эффективную тактику лечебных мероприятий. Выявление особенностей механизмов важнейших метаболических звеньев, обуславливающих варианты активности течения воспалительного процесса вирусного гепатита в печени, как ткани – мишени, представляет важную проблему практического здравоохранения. [Блохина Н.П., 1998; Серов В.В., 1999; Соринсон С.Н., 1996; Сюткин В.Е., 2000].

Значительная часть работ, посвященных исследованию патогенеза вирусных гепатитов, сосредоточена в области изучения особенностей биологии вирусных инфекций [Гендон Ю.З., 1991; Сюткин В.Е., 2000; Ющук Н.Д., 2000], генетических факторов хозяина [Михайлов М.И., 1999; Мукомолов С.Л., 1992, Соринсон С.Н., 1996], иммунного ответа [Асфандиярова Н.С., 1998; Лукина Е.В., 2000; Федорченко С.В., 1991]. В меньшей степени изучены биохимические изменения в печени, происходящие при длительном взаимодействии клеток с вирусом. При этом значительный интерес представляют все аспекты вопросов, связанных с состоянием липидов гепатоцитов [Дятловицкая Э.В., 1998; S. Kirschnek, 2000].

В последние два десятилетия в результате многочисленных исследований было установлено, что липиды являются не только формой депонирования энергетических субстратов и основной структурной компонентой клеточных мембран [Безуглов В.В., 1998; Крепе Е.М., 1981; Cullis, P.R., 1996], но и важнейшей системой биологических эффекторов, регуляторов и медиаторов, участвующих практически во всех важнейших физиологических процессах клетки [Dyatlovitskaya, E.V., 1987; Дятловицкая Э.В., 1998; Nakomori S., 1995; Neuzil J., 1998]. Особый интерес при этом представляет изучение сфингомиелинового цикла в связи с тем, что сфингомиелин и продукты его ферментативного гидролиза играют определяющую роль в сигнальной трансдукции, регулирующей ведущие клеточные процессы - иммунный ответ, рост, дифференцировку и апоптоз [Алесенко А.В., 1998; Дятловицкая Э.В., 1995; Мартынова Е.А., 1998].

Многообразие функций сфингомиелина и его производных, связанных с важнейшими клеточными событиями в норме и при патологии, определяет необходимость изучения особенностей механизмов изменений компонентов сфингомиелинового цикла в ткани печени у больных хроническими вирусными гепатитами. Такие исследования, безусловно, будут способствовать пониманию патогенеза вирусных гепатитов, возможности прогнозирования исходов и определения тактики лечения данной группы заболеваний.

Цель исследования

Исследовать роль компонентов сфингомиелинового цикла в механизмах метаболических нарушений в ткани печени у больных хроническими вирусными гепатитами.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Установить особенности функционирования сфингомиелинового цикла (активность сфингомиелиназы, содержание сфингомиелина, церамидов) в печени больных хроническими вирусными гепатитами;
2. Исследовать состав жирных кислот компонентов сфингомиелинового цикла (сфингомиелина и церамидов) в печени больных хроническими вирусными гепатитами;
3. Исследовать механизмы, участвующие в регуляции активности сфингомиелинового цикла: активность фосфолипаз и процессов перекисного окисления липидов в печени больных хроническими вирусными гепатитами;
4. В экспериментальной модели токсического гепатита изучить влияние липосом на соотношение компонентов сфингомиелинового цикла и на функциональную активность печени (по изменению биохимических печеночных тестов).

Научная новизна

Впервые в биопсийном материале печени больных хроническими вирусными гепатитами изучен сфингомиелиновый цикл и его взаимоотношение с основными механизмами фосфолипазного и перекисного повреждения липидов клетки. В результате выполненного исследования были получены новые данные фундаментального характера о метаболических нарушениях в печени, вызванных действием гепатотропных вирусов В и С. Выявленные изменения сфингомиелинового цикла у больных хроническими гепатитами, характеризуются увеличением активности сфингомиелиназы и повышением количества сфингомиелина. Эти сдвиги более выражены при микст форме гепатита. Доказано, что при вирусных гепатитах изменение активности компонентов сфингомиелинового цикла (сфингомиелина и церамидов) связано с изменением их жирнокислотного состава. Механизм нарушения функционирования компонентов сфингомиелинового цикла печени является более лабильным и выраженным, чем фосфолипазный и перекисный механизмы повреждения липидов клетки. Показано, что в отличие от моно - форм гепатитов при их микст-форме в след за ответом сфингомиелинового цикла происходит выраженная активация фосфолипазного и перекисного механизмов повреждения липидов.

На основании результатов исследования, с помощью методов препаративной химии были получены липосомы, содержащие веществ, введение которых целенаправленно модифицирует цикл сфингомиелина, обеспечивая выраженную коррекцию метаболических изменений, сопровождающих развитие экспериментального гепатита.

Практическая значимость работы

Проведенное исследование носит, в основном, фундаментальный характер. Впервые выявлены важнейшие аспекты механизмов изменения активности компонентов сфингомиелинового цикла при хронических вирусных гепатитах. Полученные данные раскрывают новые аспекты патогенеза хронического вирусного гепатита и имеют важное значение для молекулярной биологии и патофизиологии. Результаты исследования могут служить основой для новых подходов к прогнозированию течения и исходов вирусного гепатита в клинике. Значительный теоретический и практический интерес представляет дальнейшее изучение влияния отдельных компонентов сфингомиелинового цикла на процессы воспаления и их исходы при заболеваниях печени различной этиологии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У больных хроническими вирусными гепатитами В, С и микст- формой происходит нарушение соотношения компонентов сфингомиелинового цикла. Это проявляется в увеличении активности сфингомиелиназы, повышении содержания сфингомиелина и уменьшении количества керамидов в печени больных. Эти изменения более выражены при сочетанной патологии.
2. В печени больных хроническими вирусными гепатитами В, С и их сочетанной формой обнаружено изменение жирнокислотного состава молекул сфингомиелина и керамидов. При микст-форме в сфингомиелине снижается количество короткоцепочечных моноеновых жирных кислот и увеличивается содержание длинноцепочечных насыщенных кислот. Состав жирных кислот керамидов у больных всех групп меняется в сторону увеличения моноеновых жирных кислот с короткой углеродной цепью.
3. Механизмы нарушения в структуре и содержании компонентов сфингомиелинового цикла у больных хроническими вирусными гепатитами В, С и их сочетанной формой активизируются за счет фосфолипазного и перекисного типов повреждения липидов.
4. Введение липосом, содержащих модуляторы цикла сфингомиелина, крысам при экспериментальном токсическом гепатите, нормализует соотношение керамидов и сфингомиелина, а также положительно влияет на функциональное состояние печени, что подтверждено, что подтверждено биохимическими печёночными пробами и морфологической картиной ткани печени.

Апробация работы

Основные результаты представлены на научных семинарах кафедры биохимии и молекулярной биологии, региональных и российских конференциях: Первом конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2000); Втором конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2001), Третьим конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2002); Международной юбилейной конференции «Актуальные проблемы инфектологии и паразитологии» (Томск 2001); II – ой Российской конференции молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» (Москва 2001); IV Российской научно – практической конференции «Гепатит В, С и D – проблемы диагностики, лечения и профилактики» (Москва, 2001), 5th Korea – Russia International Symposium on Science and Technology (June 26 – July 3, 2001, Tomsk,

Russia), International forum "The third Millenium – the New World" (Moscow 2001), VI - ой международной конференции "Биоантиоксидант" (Москва 2002).

По теме диссертации **опубликована 21 работа.**

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 116 страницах, иллюстрирована 16 таблицами и 12 рисунками. Библиография включает 192 литературных источника, из которых 134 отечественных и 58 иностранных.

Автор выражает искреннюю признательность заведующей отделением гастроэнтерологии ОКБ г.Томска, профессору Белобородовой Э.И. за организацию обследования биопсийного материала больных, кандидату химических наук, директору ООО «Термекс II» Великому А.А. за предоставленную возможность проведения исследований на газожидкостном хроматографе, кандидату медицинских наук Рыжову С.В., кандидату химических наук, техническому директору ООО «Термекс II» Вавилкину А.С. за ценные теоретические и методические рекомендации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первая часть работы проведена на биопсийном материале больных с моно-формами хронических вирусных гепатитов В, С и их микст-формой. Биопсийный материал был получен в отделении гастроэнтерологии Областной клинической больницы г.Томска. Все больные не проходили курса лечения, и заболевание было выявлено впервые. Верификация диагноза проводилась на основании клинических признаков и подтверждалась проведением иммуноферментного анализа на наличие маркеров вирусных гепатитов, ПЦР – анализа и исследования биохимических печеночных проб (АлАТ, АсАТ, билирубин, тимоловая проба). Степень активности процесса устанавливалась цитологически по анализу биопсийного материала.

Больные были разделены на следующие группы: I - больные хроническим вирусным гепатитом В - 27 человек в возрасте от 21 до 44 года, средний возраст составил 35,5 лет; II - больные хроническим вирусным гепатитом С 23 человека в возрасте от 23 до 45 лет, средний возраст составил 37 лет и III - больные хроническим вирусным гепатитом С, сопряженным с хроническим вирусным гепатитом В (микст гепатит) 24 человека в возрасте от 24 до 43 лет, средний возраст составил 35,5 лет. Контрольную группу по биопсийному материалу составили 10 проб ткани, взятых лапаратомным доступом у пациентов в ходе хирургических операций по поводу травматических повреждений печени. Все образцы ткани хранили при -70° С. Исследованные группы больных вирусными гепатитами составили пациенты, у которых была выявлена минимальная и умеренная степень активности заболевания. В группы обследованных были включены пациенты, отрицающие употребление наркотических веществ.

Вторая часть работы проведена на 40 крысах линии Вистар обоих полов массой 170 - 250 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария и были поделены на 4 группы: I – фон (интактные животные), II – контроль (крысы с токсическим гепатитом без коррекции), III – опыт 1 (крысы с токсическим гепатитом, которым вводились «пустые» липосомы) и IV – опыт 2 (крысы с

токсическим гепатитом, которым вводились «нагруженные» липосомы). Эвтаназию животных проводили под эфирным наркозом. Для биохимических печеночных проб использовали сыворотку крови, для морфологических исследований – печень, предварительно фиксированную в спирт – формалиновом растворе. Токсический гепатит вызывали путем курсового введения масляного раствора тетрахлорметана (CCl_4). Для этого 50 % раствор CCl_4 на вазелиновом масле вводили подкожно, трехкратно с интервалом в 4 суток, из расчета 0,45 мл раствора на 100 г массы тела крысы. Инъекция липосом начинали на 4 сутки после завершения курса введения тетрахлорметана (после третьей по счету подкожной инъекции масляного раствора CCl_4). Введение липосом проводили в бедренную вену. Курс липосомальной коррекции продолжался 10 дней. Эвтаназию крыс проводили после окончания курса введения липосом.

1. Методы определения активности липолитических ферментов и состава липидов

Активность сфингомиелиназы, фосфолипазы A_2 (ФЛА₂), фосфолипазы D (ФЛD) определяли по методу Х. Брокерхофа (1978). Активность сфингомиелиназы определяли по уменьшению концентрации сфингомиелина ("ICN Biomedicals"). Выделение сфингомиелина проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) и концентрацию выражали в мМ фосфора. Активность ФЛА₂ определяли по прибыли лизофосфолипидов, выделение и анализ которых проводили методом ТСХ. Активность ФЛD определяли по количеству фосфатидной кислоты, выделение и анализ которой проводили в двухфазной системе ТСХ. Содержание сфингомиелина, церамидов, лизофосфолипидов и жирных кислот проводили методом ТСХ. Хроматограммы проявляли с помощью фосфорномолибденовой кислоты с последующим сканированием и оценкой фракций с помощью программы «Chrom 540» for Windows. Для ТСХ использовали «Silufol UV 254» (Чехия).

Анализ состава жирных кислот проводили по методу С.Н. Рыловой (1998). Для этого методом ТСХ предварительно выделяли сфингомиелин и церамиды, затем проводили извлечение и метилирование жирных кислот. Анализ спектра жирных кислот проводили на хроматографе «Цвет 800».

Биохимические методы оценки интенсивности ПОЛ и активности антиокислительных ферментов

Для определения показателей, характеризующих интенсивность процессов пероксидации липидов и активность ферментативных антиоксидантов, использовали биопсийный материал печени. Определение содержания малонового диальдегида в ткани осуществляли в реакции с тиобарбитуровой кислотой по методу К. Yagi (1976). Содержания диеновых конъюгатов определяли по методу А.В. Лебедева (1995). Активность каталазы определяли по методу М.А. Королюк (1988). Определение активности супероксиддисмутазы проводили по методу Н.А. Брусова (1976). В качестве стандарта использовали супероксиддисмутазу компании "ICN Biomedicals".

2. Методы получения липосом

Фосфатидилхолин для приготовления липосом получали по методу Е.М. Краснопольского (1999). Липосомы получали по методу Г. Грегориадиса (1983). Принцип метода основан на образовании замкнутых липосом при механической дезинтеграции тонкой пленки фосфатидилхолина, полученной выпариванием фосфатидилхолина из хлороформной фазы в вакууме. Липосомы состояли из фосфатидилхолина с добавлением жирных кислот 3,6 омега ряда и витамина Е,

а также церамиды, фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол, выделенные из печени здоровых крыс.

3. Определение биохимических печеночных проб печени.

Активность аспартат – и аланинаминотрансфераз (АсАТ, АлАТ), а также концентрацию общего билирубина (ОБР) в сыворотке крови крыс определяли стандартными методами по Ройтману и по Ендрасеку – Грофу, соответственно [N.W.Tietz, 1976], с помощью наборов реактивов фирмы «Лахема» (Чешская республика). Тимоловую пробу в сыворотке крови определяли по реакции с тимоловым реактивом («Лахема», Чешская республика).

Статистическая обработка результатов: среднее, ошибка среднего, достоверность различий между двумя параметрами (по критерию Манна - Уитни) проводилась на IBM совместимом персональном компьютере с использованием пакета статистических программ «STATGRAPHICS».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Активность сфингомиелиназы, содержание сфингомиелина и церамидов в печени больных хроническими вирусными гепатитами

Полученные в ходе исследования данные об изменении активности сфингомиелиназы, а также содержания сфингомиелина и церамидов в печени больных хроническими вирусными гепатитами представлены на рис 1.

Сдвиги в активности сфингомиелиназы печени в группе больных ХГС и больных ХГВ, по сравнению с контрольной группой не происходило, однако сочетанная инфекция вирусных гепатитов приводила к усилению активности фермента. В группе больных ХМГ обнаружено значительное увеличение активности сфингомиелиназы печени в 1,54 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой.

В группе больных ХГС и ХГВ содержание сфингомиелина остаётся практически стабильным, однако содержание церамидов в печени у данных групп пациентов снижено в 1,6 и в 1,3 раза ($p < 0,05$) соответственно. В группе больных ХМГ относительные количества данных липидов претерпевают значительные изменения. Содержание сфингомиелина увеличивается в 1,55 раза, а церамидов снижается в 1,8 раза. При сравнении выявленных изменений количеств липидов в группах ХГС и ХГВ выявляется однонаправленный их характер: повышение содержания сфингомиелина и снижение уровня церамидов.

Для выявления механизмов нарушения состояния сфингомиелинового цикла была изучена активность сфингомиелиназы - одного из ключевых ферментов в цепи превращений холинсодержащих фосфолипидов клетки, являющихся не только структурными элементами клеточных мембран, но и вторичными мессенджерами. В наших исследованиях изучалась активность нейтральной сфингомиелиназы, являющейся мембраносвязанным и Mg^{++} , Mn^{++} -зависимым ферментом. Данную изоформу сфингомиелиназы содержат плазматическая и ядерная мембрана. Известно, что именно нейтральная Mg^{++} , Mn^{++} - зависимая сфингомиелиназа воздействует на особый “сигнальный” трансдукционный пул сфингомиелина, включенный в процессы регулирования жизненной программы клетки (избирательная активность генетического аппарата, пролиферация, дифференцировка и апоптоз) [NA. Shackel, 2002].

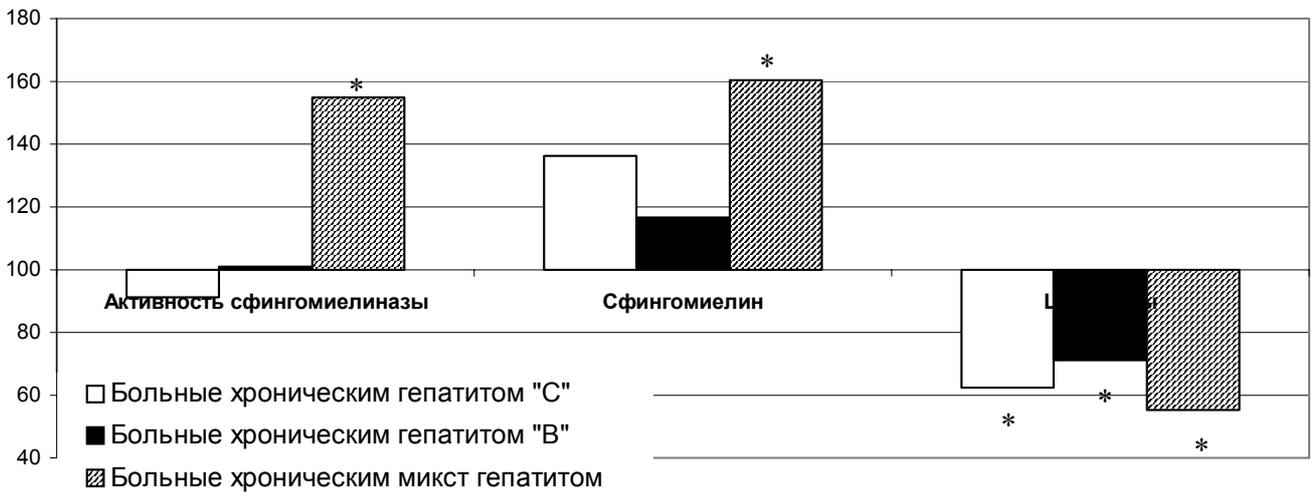


Рис. 1 Активность сфингомиелиназы, содержание сфингомиелина и церамидов в печени больных хроническими вирусными гепатитами в % от значений соответствующих показателей в контрольной группе (значения контрольной группы приняты за 100%)

Примечание: * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$)

В ходе исследования было выявлено незначительное понижение активности сфингомиелиназы в ткани печени в группе больных ХГС и более выраженное достоверное её увеличение у группы больных ХМГ (рис 1). Данные изменения совпадают с повышением относительного уровня сфингомиелина в группе больных микст гепатитом. Среди факторов, определяющих изменение активности сфингомиелиназы, как и других ферментов, ведущим является концентрация субстрата катализируемой реакции – сфингомиелина. С другой стороны, при увеличении активности фермента концентрация субстрата должна снижаться. Концентрация сфингомиелина является динамической величиной и определяется как скоростью его синтеза *de novo*, так и скоростью его деградации, под действием сфингомиелиназы. Сфингомиелин в клетке синтезируется двумя путями: 1) при взаимодействии церамида с цитидиндифосфат–холином; 2) при взаимодействии церамида с фосфатидилхолином и переносом холина на сфингомиелин. Таким образом, концентрация сфингомиелина может оставаться повышенной при увеличенной активности сфингомиелиназы, если синтез сфингомиелина *de novo* преобладает над его деградацией под действием фермента. Фактором, косвенно свидетельствующим о преобладании синтеза сфингомиелина над его гидролизом, является факт снижения уровня субстратов синтеза сфингомиелина *de novo* - церамидов (рис 1) и фосфатидилхолина (рис 2).

Ранее уровни сфингомиелина и церамидов исследовали, в основном, в опухолевых тканях и регенерирующей ткани печени [ME. Vail, 2002]. При этом был обнаружен однонаправленный характер изменений уровней церамидов и сфингомиелина. В ходе наших наблюдений выявлены разнонаправленные изменения уровней церамидов и сфингомиелина. Проведенный нами корреляционный анализ показал преобладание синтеза сфингомиелина над его распадом в группе больных ХМГ.

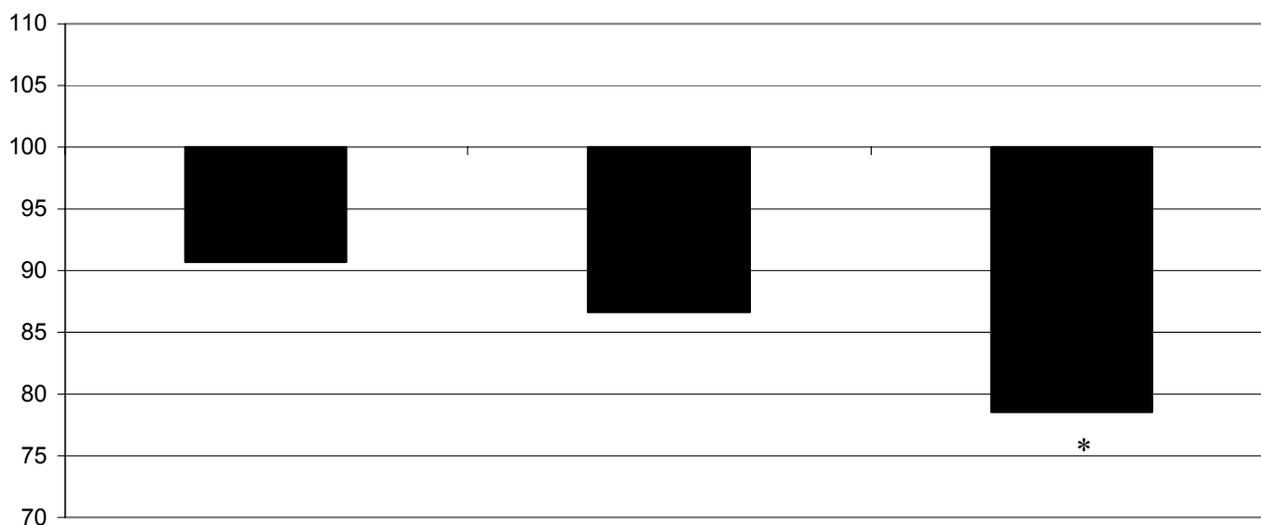


Рис. 2 Содержание фосфатидилхолина в печени больных хроническими вирусными гепатитами в % от значения этого показателя в контрольной группе (значение в контрольной группе приняты за 100%)

Примечание: * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$)

Выявленное высокое содержание сфингомиелина в группе больных ХМГ может приводить к активации протеинкиназы С, к активации экспрессии белка, ингибирующего апоптоз (bcl-2), блокированию эндонуклеаз, активации фосфолипазы D [J, Han, 2000], что, по – видимому, может способствовать затяжному хроническому течению процесса и развитию онкологических заболеваний.

Содержание жирных кислот в сфингомиелине и церамидах печени больных хроническими вирусными гепатитами

Установлено, что биологический эффект сфингомиелина и церамидов, включая их антипролиферативное действие, зависит от структуры сфингоидного основания и жирных кислот, входящих в молекулу церамида [T. Furuno, 2001]. В связи с этим в нашей работе мы изучали состав жирных кислот сфингомиелина и церамидов (таблица 1,2). Показано, что как в нормальной ткани печени, так и в ткани пораженной вирусом гепатита, спектр жирных кислот, входящих в церамиды, отличается от жирнокислотного состава сфингомиелинов. Прежде всего отмечено более высокое содержание 16:0 (пальмитиновой) кислоты в сфингомиелине по сравнению с церамидами. Эта кислота в сфингомиелине составляет около 50% от суммы жирных кислот, в церамидах её доля составляет примерно – 22-35%. Существенное различие между составными элементами церамидов и сфингомиелина во всех группах обследованных наблюдается в содержании 18:1 (олеиновой) кислоты. В церамидах её количество значительно выше, чем в сфингомиелине. Обращает на себя внимание появление в составе сфингомиелина (больные ХМГ) 18:2 (линолевой) кислоты при её отсутствии в нормальной ткани печени. Следует также отметить и более высокий уровень кислот с длинными цепями (22 – 24 углеродных атома) в сфингомиелине по сравнению с церамидами в ткани печени больных ХМГ.

Эти сдвиги являются ответной реакцией поврежденных клеток на дефицит полиеновых жирных кислот, который был зарегистрирован ранее многими исследователями при воспалительных реакциях различной этиологии [K.S. Koumanov, 2002]. Способность церамидов претерпевать метаболические перестройки и, таким образом, оказывать своё регуляторное влияние на

клеточные мишени зависит от длины жирнокислотного остатка, создающего благоприятную конформацию молекулы. Поэтому изменения длины ацила существенным образом вмешивается в эти эффекты. В свою очередь это взаимодействие зависит не только от состава жирнокислотного остатка, но и от структуры сфингоидной цепи (длина, присутствие или отсутствие двойных связей, их количество, местоположение, наличие гидроксильных групп). Короткие ацилы практически не способны к такому взаимодействию. По мере удлинения жирнокислотного остатка возникает его гидрофобное взаимодействие с цепью сфингоида, что и отражается на изменении биоэффекторных свойств церамида [АА. Galoyan, 2000].

Таблица 1

Состав жирных кислот сфингомиелина печени больных хроническим вирусным гепатитом С (ХГС), хроническим вирусным гепатитом В (ХГВ) и хроническим вирусным гепатитом С, осложненным вирусным гепатитом В (микст гепатит - ХМГ), в процентах от общего количества жирных кислот в ткани

Жирные кислоты	Обследованные группы			
	Контроль, n = 10	Больные ХГС, n = 23	Больные ХГВ, n = 27	Больные ХМГ, n = 24
14:0	Не выявлено	Не выявлено	Не выявлено	2,4 ± 0,18 *
16:0	51,8 ± 3,21	45,7 ± 3,21	44,1 ± 3,26	43,4 ± 3,42 *
16:1	2,1 ± 0,13	3,4 ± 0,26	3,7 ± 0,24	6,1 ± 0,51 *
18:0	9,3 ± 0,48	11,2 ± 1,03 *	11,2 ± 1,08 *	10,5 ± 0,98
18:1	0,9 ± 0,05	1,7 ± 0,15 *	1,5 ± 0,12 *	2,8 ± 0,21 *
18:2	Не выявлено	2,6 ± 0,23 *	2,1 ± 0,19 *	3,9 ± 0,34 *
20:0	3,5 ± 0,26	4,0 ± 0,31	3,7 ± 0,34	3,3 ± 0,28
22:0	7,1 ± 0,56	6,7 ± 0,54	8,3 ± 0,71	7,6 ± 0,67
24:0	19,1 ± 1,26	18,8 ± 1,54	19,6 ± 1,75	13,4 ± 1,25 *
24:1	6,2 ± 0,52	5,9 ± 0,45	5,8 ± 0,42	6,6 ± 0,59

Примечание: n – количество обследованных. Достоверное изменение по сравнению с контролем: * - p < 0.05.

Таблица 2

Состав жирных кислот церамидов печени больных хроническим вирусным гепатитом С (ХГС), хроническим вирусным гепатитом В (ХГВ) и хроническим вирусным гепатитом С, осложненным вирусным гепатитом В (микст гепатит - ХМГ), в процентах от общего количества жирных кислот в ткани

Жирные кислоты	Обследованные группы			
	Контроль, n = 10	Больные ХГС, n = 23	Больные ХГВ, n = 27	Больные ХМГ, n = 24
14:0	Не выявлено	Не выявлено	Не выявлено	3,9 ± 0,27 *
16:0	35,6 ± 2,35	33,7 ± 3,21	33,3 ± 2,79	22,7 ± 1,55 *
16:1	3,6 ± 0,31	4,0 ± 0,35	3,7 ± 0,24	4,3 ± 0,32
18:0	26,3 ± 2,31	26,6 ± 2,31	24,3 ± 1,78	18,2 ± 1,52 *
18:1	13,4 ± 1,26	15,2 ± 1,21 *	13,7 ± 1,21	15,9 ± 1,11 *
18:2	9,3 ± 0,89	9,9 ± 0,78	9,2 ± 0,78	9,4 ± 0,88
20:0	4,5 ± 0,38	3,7 ± 0,26 *	4,6 ± 0,33	10,1 ± 0,65 *
22:0	3,3 ± 0,25	2,8 ± 0,15 *	3,5 ± 0,22	8,3 ± 0,55 *
24:0	2,1 ± 0,18	1,8 ± 0,12	1,8 ± 0,11	4,8 ± 0,31 *
24:1	1,9 ± 0,15	2,3 ± 0,19	2,1 ± 0,17	2,4 ± 0,19

Примечание: n – количество обследованных. Достоверное изменение по сравнению с контролем: * - p < 0.05.

Полученные результаты работы свидетельствуют о том, что в ткани печени больных ХГС, ХГВ и ХМГ содержание практически всех жирных кислот компонентов сфингомиелинового цикла значительно изменяется (табл 1,2). Несмотря на отсутствие значительных сдвигов при моноформах гепатитов, при сочетанной патологией (ХМГ) содержание основных насыщенных кислот церамидов – пальмитиновой (16:0) и стеариновой (18:0) достоверно снижается. При этом отмечается выраженное увеличение в составе церамидов уровня насыщенных жирных кислот с длинными цепями (20 – 24 углеродных атома) и появление миристиновой кислоты (14:0), однако состав ненасыщенных жирных кислот значительных изменений не претерпевал. Таким образом, нами отмечена общая тенденция в изменениях уровней жирных кислот, входящих в состав церамидов ткани печени группы больных ХМГ: смещение жирно-кислотного спектра в сторону длинноцепочечных насыщенных кислот с одновременным уменьшением содержания основных кислот (пальмитиновой и стеариновой).

Что касается изменений спектра жирных кислот сфингомиелина, то основными сдвигами в группе больных ХМГ является достоверное увеличение основных ненасыщенных кислот пальмитолеиновой (16:1) и олеиновой (18:1) в составе данного сфинголипида и снижение в нем количества насыщенных кислот.

Такая направленность изменений состава жирных кислот: увеличение моноеновых и длинноцепочечных насыщенных форм свидетельствует, по – видимому, об индукции процессов перекисного окисления липидов, точкой приложения которых являются двойные связи жирных кислот. Известно, что перекисный и фосфолипазный механизмы повреждения липидов тесно связаны. Окисленные фосфолипиды легче подвергаются гидролизу фосфолипазами, а фосфолипазы, в свою очередь, нарушая целостность липидного бислоя мембран, делают липиды более доступными для свободно-радикального окисления. При этом определяющую роль играет фосфолипаза A_2 , которая приводит к синтезу простагландинов, участвующих в реализации воспалительной реакции. Фосфолипаза A_2 катализирует отщепление жирной кислоты во втором положении фосфолипидов.

Активность фосфолипаз и процесса перекисного окисления липидов печени больных хроническими вирусными гепатитами.

Активация фосфолипаз и процесса перекисного окисления липидов может существенным образом влиять на состав и количество жирных кислот, входящих в состав биоэффекторных молекул церамида и сфингомиелина. Таким способом эти два процесса могут существенно регулировать активность данных эффекторных молекул, тем самым оказывая влияние на функциональную активность сфингомиелинового цикла. Продукты действия фосфолипаз A_2 , и D оказывают прямое действие на активность сфингомиелиназы - ключевого фермента сфингомиелинового цикла [K.S. Koumanov, 2002].

Изучение активности фосфолипаз показало (рис 3), что активность фосфолипазы A_2 печени увеличивается во всех обследованных группах больных гепатитами. В группе больных ХГС активность фермента увеличивалась в 2,4 раза ($p < 0,05$), в группе больных ХГВ - в 2,1 раза ($p < 0,05$), а при микст-форме гепатита - почти в 4 раза ($p < 0,05$). Увеличение активности фосфолипазы D в 1,8 раза ($p < 0,05$) выявлено только при микст-форме гепатита.

Причиной увеличения активности фосфолипаз может служить действие фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α) - основного цитокина воспаления, а так же ряда биогенных аминов [Jr. Barnett, 2001]. Повышение активности

фосфолипазы A_2 приводит к удалению токсичных перекисленных жирно-кислотных остатков фосфолипидов из тканей. Продуктами гидролиза фосфолипидов, осуществляемого фосфолипазой A_2 , являются лизофосфатидилхолин и ненасыщенная жирная кислота (чаще всего арахидоновая). Она обладает ингибирующим влиянием на фосфолипазу A_2 . Отмеченное нами повышение активности фосфолипазы A_2 , скорее всего, связано с выявленным усилением процессов ПОЛ, приводящим к уменьшению количества длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот (арахидоновая) и увеличением моноеновых жирных кислот. Именно это и было показано в наших исследованиях состава жирных кислот сфингомиелина и церамидов (таблица 1,2).

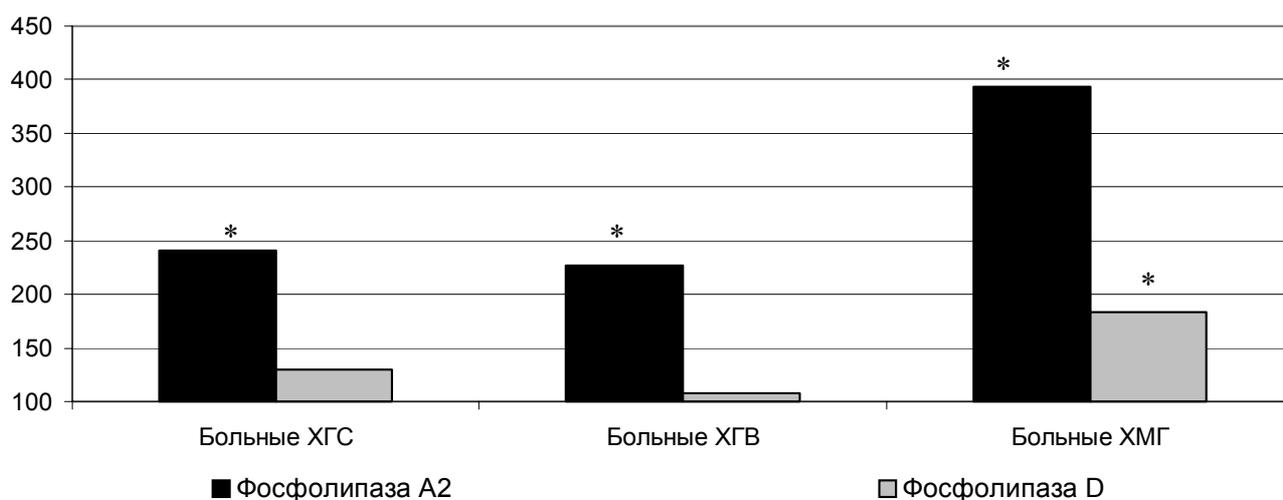


Рис. 3 Активность фосфолипазы A_2 и D в печени больных хроническими вирусными гепатитами в % от значений соответствующих показателей в контрольной группе (значения контрольной группы приняты за 100%)

Примечание: * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$)

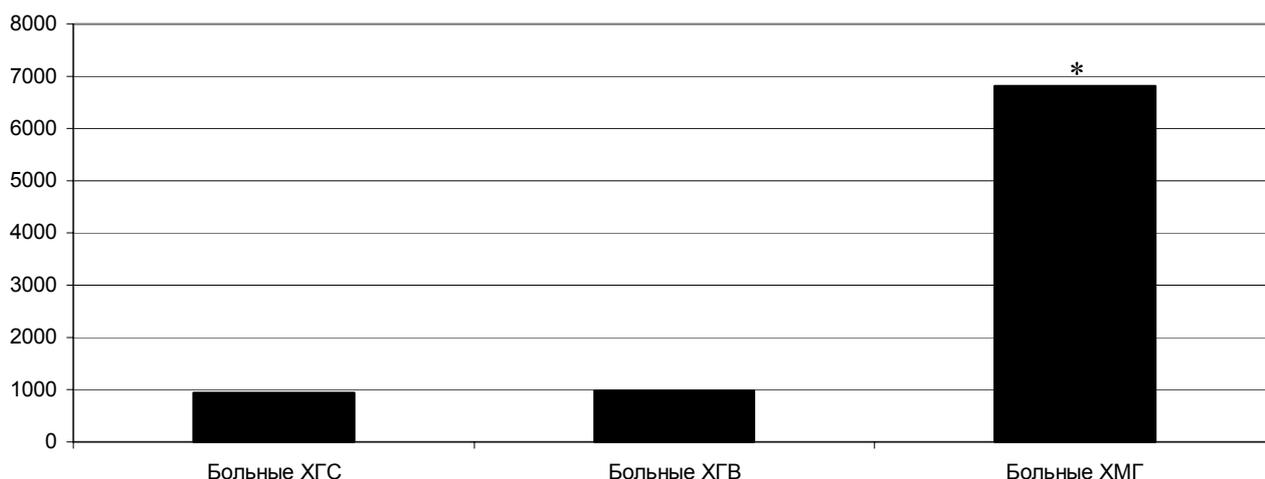


Рис. 4. Содержание лизофосфолипида в печени больных хроническими вирусными гепатитами в % от значения в контрольной группе (значение контрольной группы приняты за 100%)

Примечание: * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$)

Вторым продуктом действия ФЛА₂ является лизофосфолипид, количество которого увеличивается только в группе больных микст гепатитом (рис 4).

Вероятно, это происходит за счет увеличения фракции лизофосфатидилхолина, который обладает наибольшим из всех фосфолипидов сродством к фосфолипазе A_2 . Данный лизофосфолипид может образовываться не только под действием фосфолипазы A_2 , но и в результате повышения активности лецитин–холестерин–ацетилтрансферазы и усиления окислительных процессов, причиной которых является активации апо–В–апобелка, обладающего собственной фосфолипазной A_2 -активностью. Проведение корреляционного анализа между активностью фосфолипазы A_2 и содержанием лизофосфолипидов показало, что причиной увеличения этой фракции фосфолипидов в печени больных ХМГ является не только процесс активации фосфолипазы A_2 , но и стимуляция вышеупомянутых метаболических путей.

Активность фосфолипазы D повышалась в 1,8 раза ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой только в группе больных ХМГ. Причиной отсутствия какой-либо реакции со стороны данного фермента в группе больных моноформами гепатитов может быть: изменение количества ФНО - α , которое наблюдается практически при всех хронических нарушениях; ингибирование фермента продуктами ПОЛ или продуктами гидролиза фосфолипидов фосфолипазой A_2 [А. Tokumura, 1998]. Между показателями активности фосфолипазы D и активности сфингомиелиназы в печени больных ХМГ была обнаружена положительная достоверная корреляционная связь. Таким образом, повышенная активность фосфолипазы D может служить причиной повышенной активности сфингомиелиназы, так как продукт действия этого фермента – фосфатидная кислота является активатором сфингомиелиназы.

В связи с тем, что процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) может принимать активное участие в механизмах активации фосфолипаз и сфингомиелинового цикла, в нашей работе мы определили количество конечных продуктов ПОЛ: диеновых конъюгатов и малонового диальдегида (ТБК – активный продукт), а так же активность ферментов, участвующих в антиокислительной защите: каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) (рис 5).

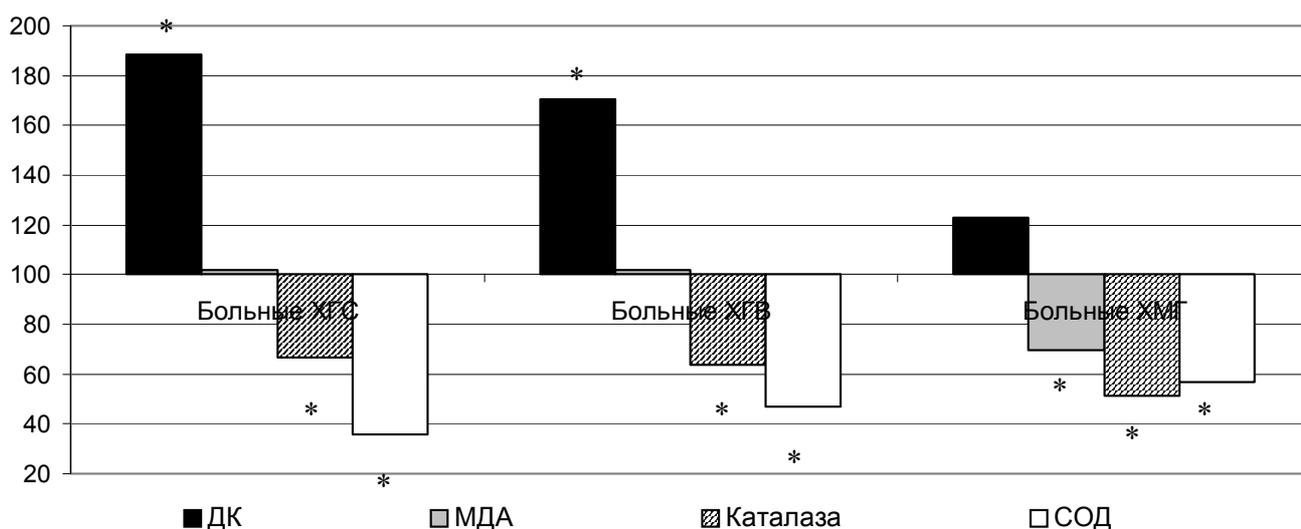


Рис. 5 Содержание диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и активность каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в печени больных хроническими вирусными гепатитами в % от значений соответствующих показателей в контрольной группе (значения контрольной группы приняты за 100%)

Примечание: * - достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0.05$)

Показано, что количество первичных продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов) повышено в группах больных ХГС и в группе больных ХГВ в 1,8 и в 1,6 раза ($p < 0,05$), соответственно. Содержание вторичных продуктов ПОЛ (малонового диальдегида) не претерпевало значимых изменений. При этом активность каталазы и активность СОД понижалась во всех группах обследованных.

Отсутствие значимых изменений этих показателей в группе больных ХМГ может быть вызвано двумя причинами. Во – первых, уменьшением концентрации субстрата для ПОЛ (ненасыщенных жирных кислот) вследствие длительного процесса заболевания, связанного с длительной индукцией процессов ПОЛ (изменения в составе и количестве жирных кислот были показаны нами выше). Во – вторых, это могло быть вызвано уменьшением стимулирующего влияния на ПОЛ свободных радикалов, которые выделяются из нейтрофилов в процессе воспаления под действием ФНО- α , вызывая, тем самым, у этих клеток кислород-зависимый механизм цитотоксичности. Уменьшение активности каталазы и СОД может происходить из-за длительного действия H_2O_2 и O^\bullet на клетку и как следствие истощения данных ферментов при хронизации процесса.

Таким образом, при хронических вирусных гепатитах наступает ряд изменений в содержании и структуре компонентов сфингомиелинового цикла и в составе соединений, влияющих на данный цикл. Во-первых, повышена активность сфингомиелиназы - ключевого фермента, от которого зависит инициация данного метаболического цикла и переход сфингомиелина в церамид. Сфингомиелин обладает пролиферативным эффектом, и его накопление связывают с развитием онкологических заболеваний. Церамиды, напротив, обладают антипролиферативным эффектом, вызывая индукцию апоптоза в трансформированных клетках [Т.М.Kolb,2002]. У больных хроническими формами гепатита наблюдается повышение количества сфингомиелина и понижение количества церамидов. Эти сдвиги более выражены у больных микст формой гепатита. Кроме того, в печени больных меняется жирнокислотный состав сфингомиелина и церамидов в сторону преобладания длиноцепочечных насыщенных жирных кислот и уменьшения насыщенности короткоцепочечных жирных кислот. Эти изменения приводят к повышению клеточных эффектов сфингомиелина и понижению эффектов церамидов. В механизмах метаболических нарушений в печени у больных вирусными гепатитами активное участие принимают изменение активности фосфолипаз (A_2 , D) и процесса перекисного окисления, продукты действия которых оказывают активирующее действие на сфингомиелиназу – ключевой фермент сфингомиелинового цикла.

По-видимому, выявленные изменения при дальнейшем течении заболевания могут приводить к развитию цирроза, а в некоторых случаях и к возникновению рака печени. С большей долей вероятности это может произойти у больных хронической микст формой гепатита, несмотря на кажущее одинаковое клиническое течение заболевания больных хроническим гепатитом С и больных хроническим микст-гепатитом.

Течение токсического гепатита в экспериментальной модели при введении липосом содержащих вещества, влияющие на цикл сфингомиелина

Выше было продемонстрировано изменение компонентов сфингомиелинового цикла в ткани печени больных хроническим гепатитом.

Вероятно, целенаправленная коррекция этих изменений может изменять течение воспалительного процесса в печени.

Для решения этой задачи у крыс в модельной ситуации был вызван токсический гепатит с помощью подкожного введения тетрахлористого углерода. В этой группе животных было подтверждено наличие однонаправленных сдвигов (функционирования сфингомиелинового цикла, активности фосфолипаз и продуктов ПОЛ), аналогичных выявленным нами у больных хроническими формами вирусных гепатитов.

На 4 сутки после завершения курса инъекций тетрахлорметана во время инициации воспаления, которое отслеживали по биохимическим печеночным тестам (АсАТ, АлАТ, билирубин, тимоловая проба), вводились липосомы, содержащие вещества, влияющие на цикл сфингомиелина. Приготовленные липосомы избирательно поглощаются печенью, таким образом увеличивается целенаправленная доставка вещества в поврежденный орган.

Для идентификации течения гепатита проводили биохимические печеночные тесты (таблице 3).

Таблица 3

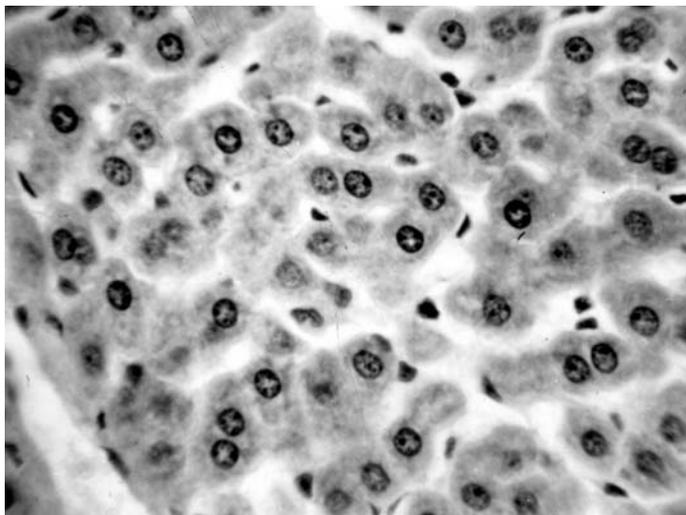
Биохимические параметры сыворотки крови интактных крыс и животных с токсическим гепатитом после курсового внутривенного введения «пустых» и «нагруженных» липосом.

	Показатели	Активность		Концентрация		ЭВП
		АсАТ	АлАТ	ОБР	ТП	
Группы животных	Контроль	0,984± 0,045	0,636± 0,066	22,21± 5,521	3,2± 1,07	100
	Группа сравнения	1,376± 0,07***	1,144± 0,079***	35,82± 3,13**	6,3± 1,21**	32
	Токсический гепатит с коррекцией «нагруженными» липосомами	1,268± 0,073**	0,522± 0,074	13,19± 5,001	2,8± 0,59	92

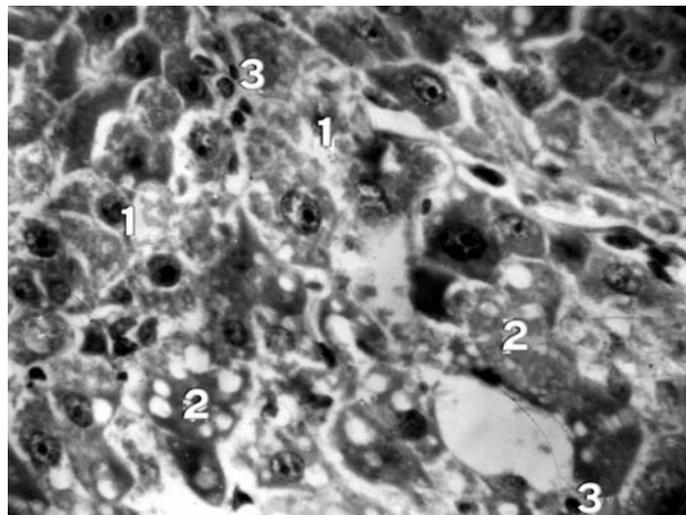
Примечание:

Контроль – интактных крысы. Группа сравнения – крысы с токсическим гепатитом без липосомальной коррекции. Активности АсАт и АлАТ – мккатал/л; концентрация ОБР (общий билирубин) – мкмоль/л; ТП (тимоловая проба) – ед. Ш. ЭВП – эффективность восстановительных процессов, % (фон – 100%). Достоверное изменение по сравнению с фоном: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$. В каждой группе всех серий было использовано по 10 животных.

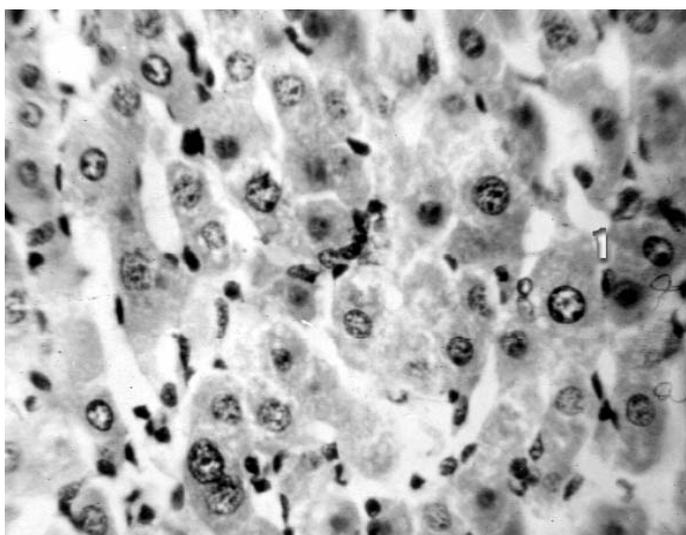
При сравнении с контрольной группой (интактные крысы), в группе сравнения (токсический гепатит) в сыворотке крови наблюдалось увеличение всех изучаемых показателей, отражающих функциональное состояние печени. В группе крыс с токсическим гепатитом после курсового введения «пустых» липосом отмечены увеличенная активность АсАТ, содержание общего билирубина, тимоловой пробы. В группе крыс с токсического гепатитом, поучавшим «нагруженные» липосомы, отмечалось лишь повышение активности АсАТ.



Печень интактной крысы (фон). Животные обследованы в рамках периода времени, который занимал эксперимент. В печеночной дольке видна сохранность клеточных структур. Окраска гематоксилин и эозин, х 400.



Печень крысы. Токсический гепатит без коррекции. Животные обследованы на четвертые сутки после введения тетрахлорметана. Большинство гепатоцитов в состоянии некроза (1). Выраженная гидропическая и жировая дистрофия (2). Единичные лимфоциты (3). Окраска гематоксилин и эозин, х 400



Печень крысы. Токсический гепатит. Животные обследованы после курса введения «нагруженных» липосом. Отдельные гепатоциты подвержены процессу мелкокапельного ожирения (1). Отмечается расширение синусоидных капилляров. Окраска гематоксилин и эозин, х 400.

Рис. 6 Морфологическое исследование печени крыс

Параллельно с исследованиями печеночных проб было проведено морфологическое исследование ткани печени. Показано (рис 6) что при токсическом гепатите без липосомальной коррекции большинство гепатоцитов находятся в состоянии некроза, наблюдается выраженная гидропическая и жировая дистрофия. В группе крыс с введение «пустых» липосом обнаружены единичные гепатоциты в состоянии некроза с умеренной гидропической

дистрофией. В группе крыс, которым вводили «нагруженные» липосомы наблюдается лишь отдельные гепатоциты, которые подвержены процессу мелкокапельного ожирения. Отмечается расширение синусоидных капилляров.

Таким образом, было доказано, что курсовое введение липосом, содержащих влияющие на цикл сфингомиелина вещества, на фоне развития экспериментального токсического гепатита может корректировать показатели, косвенно свидетельствующие об интенсивности течения воспалительного процесса в печени.

Выводы

1. Хронические вирусные гепатиты (В, С и их микст-форма) сопровождаются изменениями механизмов функционирования сфингомиелинового цикла в ткани печени, что проявляется активацией сфингомиелиназы, увеличением содержания сфингомиелина и снижением количества церамидов. Эти изменения более выражены при хронической микст-форме гепатита.
2. Нарушения жирно-кислотного состава церамидов в ткани печени при хронических вирусных гепатитах В, С и их микст форме проявляются увеличением содержания ненасыщенных жирных кислот с короткой цепью. Изменения состава жирных кислот сфингомиелина наблюдаются только при микст-форме гепатита и характеризуются уменьшением количества мононенасыщенных жирных кислот с короткой цепью и увеличением содержания насыщенных жирных кислот с длинной цепью.
3. Нарушение процессов свободно - радикального окисления липидов в ткани печени при хронических вирусных гепатитах В, С и их сочетанной форме характеризуются увеличением диеновых конъюгатов и снижением активности антиоксидантных ферментов: каталазы и супероксиддисмутазы.
4. Механизм нарушения функционирования сфингомиелинового цикла при хронических вирусных гепатитах В и С опосредован активацией процессов перекисного окисления липидов, а при микст-форме гепатита дополняется и фосфолипазным механизмом повреждения липидов.
5. Нарушения соотношения и структуры компонентов сфингомиелинового цикла, наблюдаемые при экспериментальном токсическом гепатите и имеющие однонаправленный характер с изменениями при хронических вирусных гепатитах, корректируются введением липосом, содержащих модуляторы сфингомиелинового цикла.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Характеристика ПОЛ в биоптате больных вирусными гепатитами // Сборник статей молодых ученых и специалистов “Научная молодежь на пороге XXI века. Науки о человеке” (Томск 12 – 14 мая 2000 г.) - С. 84 – 85. (в соавторстве с Нагайцевым А.В., Леготиной С.М.);
2. Исследование активности фосфолипаз гепатоцитов при воспалительных инфекционных заболеваниях печени // Материалы первой Международной юбилейной конференции, посвященной 110 – летию со дня открытия проф. К.Н. Виноградовым сибирской двуустки у человека “Актуальные проблемы инфектологии и паразитологии” (Томск 2001 г.) – С. 63 (в соавторстве с Рыжовым С.В., Новицкой Т. В., Нагайцевым и др.);

3. Особенности состава ДНК - связанных липидов гепатоцитов у больных злокачественными новообразованиями гепатобилиарной системы // Там же – С. 63. (в соавторстве с Новицкой Т.В., Рыжовым С. В., Кармалитой Е. Г. и др.);
4. Активность эндонуклеаз гепатоцитов у больных с различной степенью активности вирусного гепатита // Там же – С. 63 – 64. (в соавторстве с Нагайцевым А.В., Рыжовым С.В., Кармалитой Е.Г. и др.);
5. Модельная система для изучения особенностей репликации ДНК гепатоцитов // Там же – С. 64. (в соавторстве с Кармалитой Е.Г., Нагайцевым А.В., Серебровым В.Ю.);
6. Особенности липидного метаболизма печени больных различными видами вирусных гепатитами // Вестник российского государственного медицинского университета. –2001.- №2 (17). – С. 150. (в соавторстве с Нагайцевым А.В., Новицкой Т.В.);
7. Состав липидов и перекисное окисление липидов в печени больных вирусным гепатитом // Сборник статей молодых ученых и специалистов “Второй конгресс молодых ученых и специалистов” (Томск 17 – 18 мая 2001 г.) – С. 222 – 223.;
8. Роль клеточных липидов в апоптотической гибели гепатоцитов при вирусном гепатите // Материалы II – ой Российской конференции молодых ученых России с международным участием “Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины” (Москва 24 – 28 апреля 2001 г.) – Том 1, С. 74. (в соавторстве с Нагайцевым А.В., Рыжовым С.В., Новицкой Т.В.);
9. Изучение состава внутриядерных липидов гепатоцитов больных злокачественными новообразованиями гепатобилиарной системы на фоне хронического описторхоза // Там же – Том 1, С. 74 – 75. (в соавторстве с Новицкой Т.В., Рыжовым С.В., Нагайцевым А.В.);
10. Характеристика ферментативного гидролиза и состава липидов печени и сыворотки крови у больных вирусными гепатитами // Там же – Том 1, С 75. (в соавторстве с Рыжовым С.В., Нагайцевым А.В., Новицкой Т.В.);
11. Компоненты сфингомиелинового цикла в гепатоцитах при парентеральных вирусных гепатитах // Тезисы докладов IV Российской научно – практической конференции “Гепатит В, С и D – проблемы диагностики, лечения и профилактики” (Москва, 2001) - С. 53 – 54. (в соавторстве с Вавилкиным Д.А., Нагайцевым А.В., Новицкой Т.В. и др.);
12. Активность кислой и щелочной эндонуклеаз в печени больных хроническими вирусными гепатитами // Тезисы докладов IV Российской научно – практической конференции “Гепатит В, С и D – проблемы диагностики, лечения и профилактики” (Москва, 2001) - С. 246 – 247. (в соавторстве с Нагайцевым А.В., Рыжовым С.В., Новицкой Т.В. и др.);
13. Активность фосфолипаз гепатоцитов при хронических вирусных гепатитах // Тезисы докладов IV Российской научно – практической конференции “Гепатит В, С и D – проблемы диагностики, лечения и профилактики” (Москва, 2001) - С. 254. (в соавторстве с Рыжовым С.В., Новицкой Т.В., Серебров В.Ю.);
14. Состояние мембран липосом и активность фосфолипазы A₂ // Труды международного форума по проблемам науки, техники и образования (Москва 2001) – С. 102 (в соавторстве с Кармалитой Е.Г., Серебровым В.Ю., Новицкой Т.В. и др.);

15. Роль перекисного окисления липидов в активации встроенной в липосому фосфолипазы A_2 // VI Международная конференция Биоантиоксидант (Москва 2002) – С. 252 (в соавторстве с Кармалитой Е.Г., Серебровым В.Ю., Рыжовым С.В. и др.);
16. Перекисное окисление липидов и активность фосфолипаз в ткани печени больных вирусными гепатитами // там же – С. 423 (в соавторстве с Новицкой Т.В., Вавилкиным Д.А., Нагайцевым А.В. и др.);
17. Активность перекисного окисления липидов у больных раком печени, ассоциированным с хроническим описторхозом // там же – С. 424 (в соавторстве с Новицкой Т.В., Вавилкиным Д.А., Серебровым В.Ю.);
18. Состав компонентов сфингомиелинового цикла в печени больных хроническими вирусными гепатитами // Сборник статей молодых ученых и специалистов “Третий конгресс молодых ученых и специалистов” (Томск 16 – 17 мая 2002 г.) – С. 94 (в соавторстве с Вавилкиным Д.А.);
19. Коррекция течения токсического CCl_4 гепатита у крыс при введении липосом влияющих на цикл сфингомиелина // там же – С. 207-208 (в соавторстве с Вавилкиным Д.А.);
20. Соотношение компонентов сфингомиелинового цикла и состав липидов у больных вирусными гепатитами // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. - №8. – С. 3-5;
21. The Comparative Performance of Hepatocytes Membranes Damages at the Liver Diseases of Various Genesis in Conditions of Western Siberia // 5th Korea – Russia International Symposium on Science and Technology (June 26 – July 3, 2001, Tomsk, Russia) – P. 114 – 117.