

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ
Кафедра анатомии и физиологии человека и животных

Заведующий кафедрой
к.б.н., профессор
А.В. Елифанов

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
магистерская диссертация

ВЛИЯНИЕ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПЕРЕКИСНОЕ
ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ
АНТИПЕРЕКИСНОЙ ЗАЩИТЫ В ТКАНЯХ КРЫС В УСЛОВИЯХ СТРЕССА,
ВЫЗВАННОГО ДЕЙСТВИЕМ ЭКСТРЕМАЛЬНОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ
НАГРУЗКИ

06.04.01 Биология
Магистерская программа «Биотехнология»

Выполнила работу
студентка 2 курса
очной формы обучения

Дьякова Вероника Витальевна

Руководитель
к.б.н., доцент

Дубровский Виталий Николаевич

Рецензент
к.б.н., доцент

Трофимов Олег Владимирович

Тюмень
2022

РЕФЕРАТ

с. 54, рис. 6, табл. 1, библи. 60.

Изучена активность различных ферментов антиоксидантной системы организма, а также концентрация маркеров перекисного окисления липидов в различных тканях крыс, подвергнутых стрессу и обработанных антихолинэстеразными препаратами прозеринном и эзеринном.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, активные формы кислорода, стресс, антихолинэстеразные препараты.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. АНТИПЕРЕКИСНАЯ ЗАЩИТА	7
1.2. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА.....	8
1.3. КАТАЛАЗА.....	10
1.4. ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗА	11
1.5. ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ	12
1.6. ДИЕНОВЫЕ КОНЬЮГАТЫ	14
1.7. МАЛОНОВЫЙ ДИАЛЬДЕГИД.....	15
1.8. СТРЕСС	16
1.9 ХОЛИНЭРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА.....	23
1.9. АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА И АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЕ ПРЕПАРАТЫ	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ... 33	
1.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА МЕТОДОМ ЛОУРИ.....	34
1.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДИЕНОВЫХ КОНЬЮГАТОВ ...	35
1.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА 35	
1.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ.....	36
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	38
ВЫВОДЫ.....	48
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	49

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

САТ – каталаза

АКТГ – адренкортикотропный гормон

АОС – антиоксидантная система

АФК – активные формы кислорода

ГСТ – глутатион-S-трансфераза

ГПО – глутатионпероксидаза

ДК – диеновые конъюгаты

МФК – митохондриальный ферментный комплекс

ОВР – окислительно-восстановительная реакция

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СОД – супероксиддисмутаза

СТГ – соматотропный гормон

ХДНБ – 1-хлор-2,4-динитробензол

ВВЕДЕНИЕ

При действии на организм различных патологических факторов происходит активация свободно-радикального окисления, которое, в свою очередь, является важнейшим компонентом защиты организма. В организме постоянно происходит выработка активных форм кислорода (АФК) [Активные формы ..., с. 50-69]. Окисление биологических молекул происходит с образованием перекисных соединений, которые имеют негативные последствия для организма. Для предотвращения накопления токсичных кислородных радикалов, в организме имеется антиперекисная защита, которую составляют различные ферменты: каталаза, глутатион-S-трансфераза и супероксиддисмутаза. Быстрая активация данных ферментов помогает сохранять постоянство организма на должном уровне [Кормош, с. 29-35].

Благодаря изменению количества диеновых конъюгатов, являющихся первичным продуктом окисления высших жирных кислот, и малонового диальдегида - конечного продукта окисления, можно сделать выводы о повышении уровня перекисного окисления липидов, указывающего на ослабление антиоксидантной защиты [Crow, pp.1383-1393].

В связи с вышеизложенным нами была определена цель исследования: исследовать интенсивность перекисного окисления липидов и активность ферментов антиперекисной защиты в различных тканях крыс, подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразным препаратом.

Для реализации поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Исследовать активность ферментов антиперекисной защиты организма: глутатион-S-трансферазы, каталазы и супероксиддисмутазы в различных тканях крыс (печень, почки, КБП), подвергнутых действию стресса и обработанных препаратами прозеринном и эзерином.

2. Измерить количество первичных продуктов перекисного окисления жирных кислот: диеновых конъюгатов в различных тканях крыс (печень, почки, КБП), подвергнутых действию стресса и обработанные препаратами прозеринном

и эзерином.

3. Измерить количество конечных продуктов перекисного окисления жирных кислот: малонового диальдегида в различных тканях крыс (печень, почки, КБП), подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразными препаратами прозеринном и эзерином.

4. Обработать полученные данные, сделать выводы об активности ферментов антиперекисной защиты организма и об уровне изменения перекисного окисления липидов в исследуемых тканях различных опытных групп крыс.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. АНТИПЕРЕКИСНАЯ ЗАЩИТА

Образование АФК – неотъемлемое явление в жизни всех организмов. Для правильной и активной работы клеток, в кислородсодержащем окружении необходимо присутствие специализированных защитных систем.

Антиоксидантами являются соединения, нейтрализующие образовавшиеся свободные радикалы благодаря обмену атома на кислород свободных радикалов. Работа антиоксидантных систем (АОС) клеток контролирует свободно радикальное окисление молекул и уменьшает содержание токсичных продуктов перекисного окисления липидов. Сбои в работе антиперекисной системы приводят к накоплению окислительных повреждений, а также к возникновению окислительного стресса [Кулинский, с.2-7].

Защита тканей от метаболитов кислорода и продуктов ПОЛ делится на физиологическую (механизмы доставки кислорода клеткам), и на биохимическую (антиоксидантная система, направленная на снижение активности окислительных процессов). При этом биохимическую систему делят на специфическую, направленную на разрушение активных форм кислорода (АФК), и на неспецифическую, направлением которой является остановка образования АФК при окислительно-восстановительных реакциях (ОВР) или при микросомальных окислениях [Чанчаева, Айзаман, Герасев, с.50-58]. Система ингибирования окисления включает в себя два пути: ферментативный и неферментативный.

На нейтрализацию разрушительного воздействия АФК направлено действие различных антиоксидантных ферментов, объединенных в 3 линии защиты:

- 1) супероксиддисмутаза;
- 2) селеновая глутатионпероксидаза (ГПО) и каталаза,;
- 3) ГПО и глутатион-S-трансферазы (GST) [Габитова, Рыжикова, Рыжикова,

с. 94-96].

1.2. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

Кислород является наиболее распространенным химическим элементом, различные соединения которого присутствуют во всех живых организмах. В митохондриях благодаря окислительному фосфорилированию девятью пять процентов кислорода восстанавливается до воды, а остальные пять процентов переходят в свободные радикалы. Процессы в живых организмах, приводят к постоянному мигрированию электронов – в клетках происходят окислительно-восстановительные реакции, участие в которых принимает окисленный кислород, содержащий у себя на внешней оболочке свободную, неспаренную пару электронов. В ходе реакции присоединения электронов к кислороду происходит образование АФК. Этот процесс постоянен [Состояние антиоксидантных ..., с.100-107].

Активные формы кислорода (АФК) агрессивны по отношению к молекулам белка и ДНК, вызывают перекисное окисление липидов (ПОЛ), повреждающее мембраны. АФК участвуют в большом количестве метаболических процессов, выполняя роль сигнальных. Их присутствие необходимо в клетках, так как они являются важным фактором защиты организма от различных бактерий и инфекции, но при этом увеличение их концентрации губительно [Кулинский, с. 2-7].

В нормальных условиях кислород потребляется митохондриями в огромных объемах, после чего происходит его преобразование в супероксид-анионы, перекись водорода и гидроксильные радикалы. Антиперекисная система, представленная такими ферментами как Mn^{2+} - и Cu^{2+} -зависимыми супероксид-дисмутазами (СОД), глутатионпероксидазой (ГПО), глутатион-S-трансферазой (GST) и каталазой (САТ), способствует предотвращению избыточного образования данных радикалов. СОД способствует преобразованию супероксид-анионов в перекись водорода, которая затем преобразует ГПО и каталаза в воду [Активные формы ..., с. 50-69].

АФК являются: супероксид анион-радикал ($O^{2\cdot-}$), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($OH\cdot$), синглетный кислород (1O_2), гипохлорит ($HOCl$), также к ним относят окись азота (NO) и пероксинитрит ($ONOO^-$) (обладает высокой окислительной активностью) [Кормош, с. 29-35].

В клетке известны несколько источников АФК. Основным источником является дыхательная цепь митохондрий. Из-за утечки электронов с I и III митохондриальных ферментных комплексов (МФК) небольшая часть кислорода становится активным, происходит окислительная модификация молекул [Чеснокова, Понукалина, Бизенкова, с. 29-36]. Пероксисомы, содержащие ферменты для метаболизма перекиси водорода. В клетках пероксид водорода используется для детоксикации ксенобиотиков. Гладкий эндоплазматический ретикулум содержит цитохром-зависимые оксигеназы, продуцирующие супероксидный радикал. НАД(Ф)Н-оксидазная система, в плазмалемме макрофагов, во время воспаления образует супероксид анион. С внешней стороны мембраны благодаря поглощению кислорода фагоцитами, образуется супероксид анион-радикал [Пожилова, с. 13-22].

Окисляя молекулы АФК способны переходить из одной формы в другую. Благодаря утечке электронов с митохондриальной дыхательной цепи образуется супероксид анион-радикал, который в результате диспропорционирования переходит в пероксид водорода [Владимиров, Проскурнина, с. 1-49].

Супероксидный анион-радикал ($O^{2\cdot-}$). Играет наиболее важную роль среди АФК, так как является родоначальником других активных форм кислорода [Новиков, Левченко, Пожилова, с. 13-21]. Супероксидный радикал образуется в ходе присоединения электрона к кислороду. Соединение инициирует процессы образования АФК и ПОЛ [Владимиров, с. 13-19]. Так как $O^{2\cdot-}$ способны нанести вред клеткам, происходит образование специфичного фермент-антиоксиданта СОД, который катализирует реакцию дисмутации радикала с образованием кислорода и пероксида водорода [Melov, pp. 1395-1400].



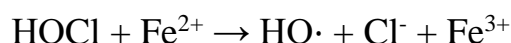
Перекись водорода (H_2O_2). Наиболее стабильное соединение из восстановленных форм кислорода. При низких концентрациях обладает невысокой реакционной способностью из-за чего играет роль сигнальной молекулы, не вызывая сильных повреждений в клетке. Высокая концентрация H_2O_2 является токсичной, вызывая гибель клеток. Наличие в клетках глутатионпероксидазной и каталазной ферментативных систем клетки создают устойчивость к воздействию перекиси водорода [Crow, pp.1383-1393].

В присутствии активаторов из пероксида водорода и супероксида образуется гидроксильный радикал.

Гидроксильный радикал ($HO\cdot$). Основным путем образования $HO\cdot$ является реакция Фентона:



Так же известен путь образования гидроксильного радикала реакцией разложения гипохлорита:



Гидроксильный радикал является самым опасным и наиболее реакционноспособным АФК. За короткое время он способен разрушить все клеточные структуры. При этом не обладает способностью диффундировать [Фархутдинов, с. 146-152].

1.3. КАТАЛАЗА

Каталаза – фермент антиоксидантной защиты с самым высоким показателем оборота для ферментов: одна молекула каталазы разлагает около шести миллионов молекул пероксида водорода, токсичного продукта утилизации кислорода, до воды и кислорода в течение минуты [Ighodaro, Akinloye, pp. 287-293].

Каталаза – хромопротеид с молекулярной массой около 240000 Д, состоящий из 4 субъединиц, имеющих по одной группе гема и сайту связывания с НАДФН. НАДФН расположен на поверхности, при этом гем располагается в

углублении каждого мономера. НАДФН защищает фермент от окисления своим же субстратом H_2O_2 . Доступ к гему активного центра осуществляется через воронкообразный канал глубиной 30 Å и шириной 15 Å [Латюшин, Павлова, Мамылина, с. 319-326].

Каталаза, как один из ферментативных антиоксидантов, относится к первому звену внутриклеточной защиты от активных форм кислорода.

Фермент использует железо или марганец в качестве кофактора и метаболизирует перекись водорода, предотвращая его накопление в клетке. Одновременно с этим происходит процесс образования воды и кислорода, завершается процесс детоксикации, имитируемый СОД. Каталаза – это высокоактивный фермент, который не требует энергии для активации. Снижение активности фермента возникает при избытке метионина, цистина, меди, цинка [Chelikani, Fita, Loewen, pp. 192-208].

Фермент всегда находится в системах, где происходит транспорт электронов при участии цитохромов и образуется токсичное соединения перекиси водорода. САТ находится в основном в пероксисомах клетки, но так же содержится и в печени, почках, мышцах, головном и костном мозге, эритроцитах, спинномозговой жидкости, также ее активность можно определить и в моче. Фермент отсутствует в митохондриях клеток, при этом присутствует в митохондриях сердечной мышцы. Самая высокая активность каталазы в печени и в эритроцитах [Boon, Downs, Marcey, pp. 35-38].

1.4. ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗА

Глутатион-S-трансферазы (GST) являются многофункциональным детоксифицирующим суперсемейством ферментов, катализирующим глутатион-связывающие токсины. Так же эти ферменты способны на пассивное связывание эндо- и экзогенных молекул токсинов, канцерогенов, различных препаратов и продуктов окислительного стресса [Калинина, Чернов, Новичкова, с. 299-348].

Глутатион-S-трансфераза может осуществлять восстановление

липоперекисей на мембранах благодаря восстановленному глутатиону. Происходит снижение последствий окислительного стресса без предварительного фосфолипазного гидролиза. В ходе конъюгации глутатиона с продуктами ПОЛ происходит выведение их из организма [Кулинский, Колесниченко, с. 255-277].

Известны три надсемейства GST: цитозольное, митохондриальное и микросомальное.

У млекопитающих GST присутствует во всех органах и тканях, но наибольшая концентрация фермента отмечается в печени. На долю цитозольных изоформ приходится примерно 90% активности GST в клетке.

Одной из функций глутатион-S-трансферы является детоксикация ксенобиотиков путем катализирования нуклеофильной атаки GSH на электрофильные атомы углерода, серы или азота неполярных ксенобиотических субстратов, тем самым предотвращая их взаимодействие с критическими клеточными белками и нуклеиновыми кислотами.

Наряду с детоксикацией GST участвует в работе антиоксидантной системы. Он способен восстанавливать гидроперекиси до спиртов, используя в качестве косубстрата GSH [Eaton, Vammler, pp. 156-164].

1.5. ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

Важной особенностью активных форм кислорода считается их способность инициировать процесс ПОЛ, идущий по свободнорадикальному механизму в клеточных мембранах. Реакции липопероксидации, происходящие на низком стационарном уровне, участвуют в постоянном обновлении мембран клеток. При этом они могут существенно изменять их структуру и функции. Немаловажную роль ПОЛ играют в процессах фагоцитоза, метаболизации ксенобиотиков печенью и в биосинтезе биологически активных веществ [Гинзбург, Соснова, с. 36-37].

В качестве субстратов ПОЛ используют полиненасыщенные жирные

кислоты и липиды плазмы крови – холестерин, триглицериды.

Известно, что первичным стабильным продуктом процесса окисления ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов являются гидроперекиси, из-за чего данный процесс носит название перекисного. В результате перекисной деградации фосфолипидов происходит появление молекул с двойными связями (диеновые конъюгаты), являющиеся первичными продуктами ПОЛ. Доказано, что первичные продукты перекисного окисления липидов способны влиять на скорость роста организма и на проницаемость биомембран.

При дальнейшем присоединении молекул кислорода происходит рост цепи и образование вторичных продуктов перекисного окисления липидов – кетодиенов и сопряженных триенов.

Конечные продукты ПОЛ представляют собой вещества, прореагировавшие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК- активные продукты или (малоновый диальдегид)). Они могут сильно повлиять на активность фагоцитов, ингибируют дыхательный «взрыв», продукцию супероксидного радикала нейтрофилами, а также обладают высокой хемотаксической активностью [Александрова, с. 1-7].

В ПОЛ участвуют свободные радикалы ненасыщенных жирных кислот клеточных мембран. При активации данных процессов происходит нарушение многих функций мембран: барьерной, рецепторной и каталитической.

Выделяют три основных механизма повреждения мембран при ПОЛ:

1) Нарушение гидрофобного бислоя, приводящее к увеличению пассивной проницаемости для ионов, вследствие появления гидрофильных гидроперекисных групп в полиненасыщенных жирных кислотах фосфолипидов.

2) Появление диальдегидов (малонового) при липоперекислении, способное вызвать полимеризацию и агрегацию белков и липидов в мембране;

3) Окисление перекисными радикалами аминокислотных остатков мембранных белков (гистидина, триптофана), вызывающих потерю ферментативной активности.

Данные изменения приводят к сбою в функционировании биомембран. По

своей природе ПОЛ является процессом переноса кислорода на субстрат, в ходе которого образуются пероксиды и другие соединения. Данная реакция цепная, происходит под влиянием АФК [Узбеков, с. 97-103].

Наиболее активным является супероксидный анион, действующий как окислитель, в результате чего образуется пероксид водорода. Так же он может быть и восстановителем, при этом будет образовываться молекулярный кислород. Водород, находящийся в α -положении по отношению к двойной связи, легко отрывается от углерода, в результате чего в молекулах жирных остатков возникает система сопряженных двойных связей (конъюгированных диенов). Они довольно легко могут взаимодействовать с молекулами кислорода, образуя при этом пероксидные радикалы, а далее и гидропероксиды (первичные продукты ПОЛ). Все это позволяет оценивать состояние процессов перекисного окисления липидов по содержанию первичных (диеновых конъюгатов и кетодиенов), вторичных (малонового диальдегида) и конечных продуктов (основания Шиффа) процесса перекисного окисления [Гаврилова, с. 15-22].

Повышение уровня ПОЛ наблюдается при различных интоксикациях и патологических состояниях. При этом известно, что поврежденные ткани наиболее сильно подвержены перекисному окислению липидов.

1.6. ДИЕНОВЫЕ КОНЪЮГАТЫ

Диеновые конъюгаты – неустойчивые соединения, образующиеся во время радикального окисления липидов. Водород в молекуле ПНЖК, находится в α -положении по отношению к двойной связи, благодаря чему может легко отрывается от углерода, при этом возникает система сопряженных двойных связей. Это объясняется тем, что атом углерода приобретает sp^2 -гибридизацию и может образовывать π -связь с другими атомами. Так как соединения неустойчивы, они могут легко окисляться, образуя пероксидные радикалы [Зентов, Ланкин, Меньщикова, с. 141].

1.7. МАЛОНОВЫЙ ДИАЛЬДЕГИД

Во время перекисного окисления липидов происходит выделение множества цитотоксических продуктов, таких как альдегиды. Эти молекулы могут действовать внутри и снаружи клетки благодаря своей хорошей реакционной способности. Взаимодействуя с различными белками, они могут сильно навредить процессам, благодаря которым клетки правильно функционируют [Воскресенский, Левицкий, с. 563-583].

Малоновый диальдегид (МДА) образуется в результате перекисного окисления жирных кислот, которые в своем составе имеют более трех двойных связей (линоленовая и арахидоновая кислоты). МДА может реагировать с первичными аминами, что приводит к образованию шиффовых оснований. Считается, что в лизосомах в ходе аккумуляции конъюгированных шиффовых оснований, образовавшихся в результате прореагировавших друг с другом МДА и липидов, откладывается пигмент старения липофусцин [Tsikas, pp. 13-30].

Благодаря МДА повреждаются различные функции и свойства биологических мембран, а именно ионный транспорт, ферментативная активность и способность детерминантов агрегировать на клеточной поверхности. Нарушение этих процессов происходит из-за полимеризации и перекрестного связывания компонентов мембран. МДА может также связываться с азотистыми основаниями ДНК [Узбеков, с. 97-103].

Реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) повсеместно используются для определения гидроперекисей. Они основаны на способности ТБК вступать в реакции с малоновым диальдегидом. МДА по своей природе являются конечным продуктом окислительной дегградации липидов, а так же промежуточным продуктом ферментативного окисления арахидоновой кислоты. Имеются доказательства о количественной взаимосвязи липидной пероксидации с МДА. О количестве липидных перекисей свидетельствуют продукты, образовавшиеся в ходе ТБК-теста [Маханова, с. 231-234].

1.8. СТРЕСС

Стресс — совокупность неспецифических адаптационных реакций организма на воздействие различных неблагоприятных факторов–стрессоров, нарушающих гомеостаз, а также соответствующее состояние организма в целом. Факторы среды, воздействующие на организм, вызывают ответную специфическую реакцию, адекватную раздражению. Стрессовая реакция включает в себя набор генетически закрепленных процессов на клеточном уровне, вызывает усиление функционирования органов и приводит к общей мобилизации организма. Активации систем стресса и реализации повреждающих эффектов препятствуют стресс-лимитирующие системы [Хныченко, Сапронов, с. 2-15].

Во время адаптации к стрессу в организме происходит изменение метаболических процессов. Трудно определить, когда наступает стадия адаптации и повышается резистентность организма к повреждающим факторам. Показателем, по которому можно определить состояние организма, являются биомембраны. Стресс-факторы вызывают усиленную регенерацию метаболитов кислорода и процессов перекисного окисления липидов, приводящие к разрушению структур мембран и к гибели клетки.

Благодаря равновесию между перекисным окислением и антиперекисной активностью сохраняется нормальная жизнедеятельность клеток. Смещение данного равновесия является первым звеном в развитии стресс-реакции, которое запускает специфические механизмы защиты клеток [Влияние холодого ..., с. 22-25].

Ацетилхолин служит помощником в передаче нервных импульсов с постганглионарных парасимпатических нервов на иннервируемые клетки, а норадреналин представляет собой нейромедиатор нервных импульсов постганглионарных симпатических волокон. При выделении, как ответ на нервный импульс, медиатор проникает в синаптическую щель. Происходит достижение реактивных структур постсинаптической мембраны. В результате

происходят многочисленные реакции, тормозящие или возбуждающие иннервируемые клетки.

Нервные клетки гипоталамуса под влиянием афферентных импульсов продуцируют полипептидные релизинг-факторы, которые поступая в гипофиз, стимулируют синтез гормонов гипофиза - соматотропного гормона (СТГ) и адренотропного гормона (АКТГ), активируя при этом надпочечники, щитовидную железу. Это и является причиной повышения устойчивости к различным стрессорам.

Селье выделил три стадии общего адаптационного синдрома:

1. Стадия тревоги. Происходит мобилизация защитных механизмов организма, а именно усиление распада органических веществ в тканях, выделение адреналина (увеличивается поступление глюкозы мышцам и мозгу). Стимуляция гипофизом АКТГ приводит к резкому росту секреции глюкокортикоидных и минералокортикоидных гормонов, угнетению работы половых желез.

2. Стадия адаптации наступает при продолжительном действии стресс-фактора. Происходит рост сопротивляемости организма стрессу и усиление функции надпочечников, нормализуется обмен веществ и количество кортикостероидных гормонов, разжижается кровь. Обмен веществ начинает происходить с преобладанием синтетических процессов, вследствие которых происходит восстановление массы тела и продуктивности животных.

В своём развитии стрессовое состояние животного обычно проходит только стадию тревоги и стадию резистентности (адаптации). Если стрессов недостаточно силён, то стадия истощения не наступает. Только при длительном воздействии различных фактором стресса можно говорить о переходе к стадии истощения.

3. Стадия истощения начинается при угнетении всех систем организма, а именно при угнетении адаптивной деятельности надпочечников. Все симптомы резко усиливаются.

Действие сильного и длительного по времени действия раздражителя

приводит стрессорные механизмы нейрорегуляции в состояние сильного возбуждения. Катехоламины и глюкокортикостероиды содержатся на высоком уровне в гуморальных средах организма, что приводит к повреждениям внутренних органов, адаптация не наступает. Стадия истощения сначала приводит организм к дистрофическим расстройствам, позже наступает дистресс. При этом действия стресс-фактора вызывают необратимые изменения в организме, приводящие к заболеваниям животного, а также к его гибели [Геворкян, Геворкян, с. 3].

Стресс-реакция вызывает не только изменения физиологического состояния, но и адаптивные изменения поведенческих функций, которые обусловлены индуцированными стрессорами головного мозга процессами. В полушариях происходит формирование сигналов, поступающих в гипоталамус и вызывающих активацию симпатической нервной системы и оси ГГНС, что и вызывает изменение поведенческих реакций. Однако, несмотря на большое количество исследований данной сферы, центральные процессы стресс-реакций и их механизмы остаются открытыми из-за сложности организации ЦНС.

В то же время, в последние годы появляются все большее количество исследований о ключевой роли холинэргической системы в формировании реакции ЦНС на стресс, а также о ее влиянии на формирование депрессии у людей [Picciotto., Nigley, Mineur, p. 116-129; Gilad, p. 116-129]. Данная гипотеза базируется на результатах исследований о роли ХЭ-системы в развитии депрессии. Впервые эта гипотеза была сформулирована еще в 1972 г. Далее в исследованиях 1980 г. было показано, что введение в организма человека ингибиторов АХ-эстеразы эзерина вызывает тревожность и депрессию, а повышение уровня кортизола активирует ГГНС [Mood and behavioral effects..., p. 1545-1546].

Длительное неизбежное воздействие стрессовых факторов на организм, как и чрезмерное воздействие на сенсорные системы (например, шум, перегрузка вестибулярного аппарата), может приводить к формированию патологических отклонений на клеточном уровне и проявляться морфологически

регистрируемыми нарушениями в головном мозге, ткани надпочечников, слизистой оболочке желудка и других органах.

Согласно новейшим исследованиям, развитие депрессии включает в себя активацию ХЭ-системы. Эксперименты с грызунами подтвердили, что повышение уровня АХ в головном мозге при введении эзерина вызывает изменение поведенческих реакций, сходных с развитием депрессии у людей. При введении эзерина в гиппокамп также активирует подобные изменения, что показывает влияние гиперактивности холинэргической трансмиссии в гиппокампе на развитие стресс-реакций длительного характера [Higley, Picciotto, pp. 88-95].

Однако долгое время роль гиперактивации ХЭ-системы оставалась непонятной в адаптивных изменениях поведенческой симптоматики. Проблема заключалась в том, что стресс и депрессия являются состояниями функций головного мозга, длящимися десятки минут, часы и дни. Состояние функций ЦНС, как правило, рассматривается в связи с системами нейромодуляторов (серотонин, дофамин, норадреналин), которые осуществляют так называемый объемный механизм передачи информации диффузией нейромодуляторов в межнейрональном пространстве, изменяя быструю синаптическую трансмиссию, осуществляемую нейротрансмиттерами. В связи с тем, что АХ, секретлируемый нейронами, гидролизуется АХЭ, считалось, что в ЦНС его возбуждающее действие, по аналогии с нервно-мышечными синапсами, ограничивается синапсом (пространство между пресинаптическим и постсинаптическим нейронами). Поэтому традиционно состояния стресса и депрессии в головном мозге объяснялись активацией серотонинэргической и норадренэргической систем, но не холинэргической системы [Delgado, p. 7-11; Delgado, Moreno, p. 5-12].

Холинэргическая система также участвует в развитии послеоперационных когнитивных расстройств. Одной из ведущих причин развития делирия в послеоперационном периоде также считается дефицит ацетилхолина с последующей дисфункцией холинэргической системы. К патогенетическим

механизмам, которые могут приводить к развитию этих осложнений, относят: периферический воспалительный ответ организма на хирургическую травму с последующим развитием воспаления нейронов, нарушение целостности гематоэнцефалического барьера с дальнейшим нейрональным повреждением, нарушение церебральной ауторегуляции, снижение доставки кислорода, гипергликемию, предшествующие нейродегенеративные заболевания, накопление металлов в головном мозге.

Исследования молекулярных форм АХЭ в головном мозге грызунов показывают, что она может осуществлять объемный механизм передачи информации путем диффузии в пространстве между нейронами. Функции АХЭ существенно различаются в нервно-мышечных синапсах и головном мозге. В нервно-мышечных синапсах АХЭ представляет собой фермент, состоящий из каталитических субъединиц, связанных с коллагеновым хвостом. Молекулы АХ, секретлируемые моторными нейронами, достигают никотиновых рецепторов в мышцах, и чрезвычайно быстро активируется А12 АХЭ.

Холинергические трансмиссии в межнейронных и нервно-мышечных синапсах имеют ряд отличий. Одним из таких отличий является отсутствие А12 АХЭ в синаптической щели в межнейронных синапсах. АХ-эстераза присутствует в них только в глобулярных формах (в основном 04), которые секретруются пресинаптическими и постсинаптическими нейронами или клетками глии и не концентрируются в синаптической щели. Поэтому 04 АХЭ регулируют концентрацию АХ не в синапсах, а в большом межнейрональном пространстве и с малой скоростью [Dunant, Gisiger, p. 1300].. Экспериментальные данные, полученные прямым измерением концентрации АХ в различных областях головного мозга, стали основанием представления о том, что в ЦНС АХ действует в большей степени как местный гормон, нежели чем быстрый нейротрансмиттер в синапсах. Предполагается, что регуляция функций ЦНС АХ – это процесс, в котором относительно постоянная концентрация АХ в межнейрональном пространстве определяется балансом секреции в него АХ и внесинаптическими АХ-эстеразами [Dunant, Gisiger, p. 1300]. В пользу этой

концепции свидетельствует и локализация рецепторов АХ в нейронах головного мозга.

Холинергическая гипотеза депрессии рассматривается как современная альтернатива моноаминовой гипотезе. Одним из аргументов в пользу холинергической гипотезы является то, что она подтверждается не только в условиях развития поведения грызунов, сходного с депрессией в результате хронического действия стресса, но и в условиях адаптивных изменений поведения и физиологического состояния однократным стрессом.

Известно, что наступление клинического эффекта применения антидепрессантов при депрессии наступает не ранее двух-трёх недель от начала приёма препарата. Отсроченность эффекта представляется возможным объяснить за счёт изменения в течение указанного срока интенсивности пролиферации в нейрогенных зонах мозга и облегчения миграции нейробластов к областям их окончательной дифференцировки и встраивания. Кроме того, подтверждение этой гипотезы позволило бы ответить на вопрос о первичной или вторичной вовлечённости нарушений нейрогенеза, наряду с дисбалансом нейромедиаторных систем, в патогенез депрессивных расстройств.

Между холинергической и моноаминовой гипотезой нет принципиальных противоречий в том случае, если активация холинергической трансмиссии при стрессе первична по отношению к переменам моноаминовой системы головного мозга, однако исследований на эту тему практически нет.

Однако факты, являющиеся основой холинергической гипотезы стресса, сомнения не вызывают. Повышение уровня АХ при введении физостигмина инъекционным путем вызывает те же изменения поведенческих характеристик и физиологических параметров у грызунов точно такие же, как и стресс. В то же время, действия хронического стресса, вызывающего изменение поведенческих функций у грызунов, сопровождаются неизменным повышением уровня АХ в головном мозге животных.

При воздействии химических веществ важной особенностью нарушений гомеостаза является непосредственное повреждающее влияние на различные

механизмы регулирования гомеостаза, начиная от низших уровней до гипоталамических и кортикальных. В этом случае нарушение процессов регуляции становится ведущим патогенетическим механизмом химической интоксикации.

Стресс-реакция в начале интоксикации маскируется типичными для данного яда симптомами отравления, и лишь в дальнейшем проявляются общие биохимические и функциональные сдвиги, характерные для соответствующей стадии стресса.

Наиболее серьезные сдвиги гомеостаза наступают при остром воздействии летальных и сублетальных доз яда. Стресс-реакция при острых экзогенных отравлениях не всегда протекает однотипно и имеет ряд особенностей в зависимости от того, какой конкретный патологический механизм лежит в основе отравления.

При отравлении антиХЭ веществами экзотоксический стресс сопровождается усилением секреторной деятельности гипофиза. На первом этапе развивается нормальная стресс-реакция, сопровождающаяся кратковременным усилением секреции катехоламинов, глюкокортикоидов и минералокортикоидов, происходит повышенный выброс нейрогипофизом вазопрессина.

Далее наблюдается гиперергическая реакция, приводящая к более продолжительной секреции данных гормонов. Затем вследствие длительного и интенсивного воздействия нейротропных веществ на механизмы регулирования гомеостаза происходит истощение запасов катехоламинов. В ранние периоды интоксикации возможно падение или полное отсутствие синтеза катехоламинов или некоторых других гормонов. На последней стадии на фоне гормонального дисбаланса происходит снижение общего уровня стресс-реакции.

При тяжелых интоксикациях может происходить ослабление физиологических механизмов стресса. Это проявляется в большей степени, если отравление протекает с резким напряжением вегетативной и гуморальной регуляций жизненных функций в связи с непосредственным вмешательством

холинотропных веществ в функционирование гипофизадреналовой системы.

Адаптивные возможности организма при воздействии химических факторов внешней среды зависят от того, на какое звено холинергической системы действует токсический агент.

1.9 ХОЛИНЭРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА

Ацетилхолинэстераза (АХЭ) является основным ферментом, который гидролизует ацетилхолин в периферической и центральной нервной системе, тем самым регулируя концентрацию АХ путем деградации. АХЭ является одним из ведущих в механизме трансдукции нервных импульсов в ХЭ синапсах животных и человека. АХЭ присутствует на высоких уровнях в мозге и нервах и на поверхностях эритроцитов. Кроме того, гидролиз ацетилхолина катализируется связанным менее специфичным ферментом, бутирилхолинэстеразой который присутствует в сыворотке крови, поджелудочной железе, печени и центральной нервной системе. Физиологическая функция бутирилхолинэстеразы до сих пор не была исследована до конца.

Необратимые ингибирования АХЭ в нервной системе приводит к блокаде проведения нервных импульсов, вызывая тем самым нарушения в нормальных функционированиях организменных систем и в итоге приводя к гибели организма. Однако роль ХЭ системы заключается также в высвобождении адренокортикотропного гормона из гипофиза. Кроме того, АХЭ играет немаловажную роль в факторах формирования длительного стресса и депрессии, что будет рассмотрено ниже.

Исследования показали, что ингибиторы ХЭ могут применяться в терапии, при воспалительных заболеваниях, заболеваниях органов глаз для лечения глаукомы, а также во многих других сферах. Другие же ингибиторы, которые пересекают гематоэнцефалический барьер, были одобрены или находятся в клинических испытаниях для лечения болезни Альцгеймера. Некоторые

ингибиторы играют существенную роль в установлении причин смерти в судебной медицине.

Исследования показали, что ингибиторы ХЭ, такие как физиостигмин и неостигмин у крыс улучшают выживаемость, так как активизируется холинергический противовоспалительный путь. При увеличении холинэргических функций, путем ингибирования двух ферментов может оказать положительное клиническое воздействие на некоторые заболевания. Исследование чувствительности ХЭ к ингибиторам *in vitro* имеет важное значение для того, чтобы оценить терапевтическую эффективность их ингибиторов. Так как крыса является животным, на которых очень часто ставят эксперименты и изучают разные виды болезней.

В литературных источниках указывается, что у животных с повышенной адаптацией к стрессу снижается активность ХЭ в гомогенатах хвостатого тела и надпочечников, а также обнаруживаются однонаправленные изменения активности АХЭ и Na,K-АТФазы, что указывает на участие холинэргических систем в изменениях, происходящих при развитии стресс-реакции и оказывает непосредственное влияние на адаптационные характеристики к экстремальным внешним факторам.

Кроме того, исследование влияния и участия АХЭ в формировании стресс-реакций позволяет также оценить ее участие в формировании иммунологической реактивности и показателей иммунного статуса, изменений полового поведения крыс и антиоксидантного статуса сперматозоидов, поскольку в литературе указываются данные о морфологических изменениях в семенниках и изменениях полового поведения с учетом особенностей холинэргической системы и ее влияния в данных аспектах.

Лекарственные средства, обладающие болеподавляющими свойствами, называются антихолиэстеразными. Вызывая накопление ацетилхолина в непосредственной близости от холинэргических нервных окончаний, таким образом они симулируют чрезмерную стимуляцию холинэргических нервных рецепторы в ЦНС и ПНС. Холинэргические нейроны широко распространены,

поэтому АХЭ-средства обладают широким спектром применения в качестве токсически агентов, а также в виде пестицидов и потенциальных боевых газов, обладающих нервнопаралитическими свойствами. Тем не менее, многие из препаратов данного списка используются в качестве терапевтических агентов, а некоторые, пересекающие гематоэнцефалический барьер, применяются в клинических испытаниях лечения болезни Альцгеймера.

До 1940х годов АХЭ были известны только обратимые, из которых особенно выделяется физостигмин, также известный как эзерин. В 1940х годах во время Второй мировой войны новый класс токсических соединений был разработан Шредером сначала в качестве пестицидов и инсектицидов, а позднее – и в качестве боевых отравляющих веществ. Крайняя токсичность фосфорорганических соединений обусловлена необратимой активацией АХЭ, приводящей к длительной ингибирующей активности. Фармакологические действия классов ПВС схожи качественно, что позволяет рассмотреть их как одну группу.

1.9. АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА И АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Ацетилхолинэстераза - гидролитический фермент из семейства эстераз, содержится в синапсах, катализирует гидролиз нейромедиатора ацетилхолина до холина и остатка уксусной кислоты. Считается ключевым элементом гомеостатического контроля врожденного иммунного ответа. При ингибировании данного фермента происходит блокировка нервных импульсов. Ацетилхолинэстераза присутствует в мозге, на поверхностях эритроцитов.

Уже на начальной стадии стресса ацетилхолиновая система, быстро адаптируется и участвует в формировании неспецифического и специфического компонентов [Петров, Харламова, Никольский, с. 160-167].

Выделяют два основных типа холинорецепторов: 1) Н-холинорецепторы (никотиновые). При активации катализируют изменение проницаемости мембраны для ионов натрия. 2) М-холинорецепторы (мускариновые).

Усиливают продукцию циклических нуклеотидов, вызывая небольшие изменения в проницаемости мембран клеток.

Ингибиторы АХЭ взаимодействуют двумя способами: с активным центром или с периферическими связывающими участками фермента. Антихолинэстеразными называются такие вещества, которые подавляют активность холинэстеразы — фермента, катализирующего гидролиз ацетилхолина.

Из многочисленных веществ этой группы будут рассмотрены эзерин, прозерин, галантамин, армии, фосфакол и пирофос. Действие антихолинэстеразных веществ сходно с действием холиномиметических агентов. Однако их действие на клетку-исполнитель не прямое, а косвенное, через ацетилхолин. Они предохраняют естественный медиатор ацетилхолин от разрушения холинэстеразой, вступая в соединение с этим ферментом. Образующийся при этом комплекс медленно гидролизуется. В связи с этим в тканях содержатся малые количества холинэстеразы и действие ацетилхолина на органы усиливается и удлиняется [Северин, с. 233]. При денервации органов (перерезка и перерождение нервов) антихолинэстеразные вещества не проявляют характерного для них эффекта. Как уже было сказано, ацетилхолин образуется у окончаний эффекторных нервов при прохождении нервного импульса. А когда нервы перерезаны, нет условий для образования ацетилхолина. В противоположность этому холиномиметические вещества и при отсутствии медиатора вызывают возбуждение холинреактивных систем. Если перерезать глазодвигательный нерв и после известного срока, необходимого для отмирания нервных окончаний, закапывать в глаз пилокарпин, то он будет сужать зрачок, в то время как эзерин этого эффекта вызывать не будет [Яковлев, с. 77].

АХЭ является одним из наиболее изученных ферментов, а также первым синаптическим белком, который удалось выделить и очистить [Marnaу, Nachmansohn, p. 359-367]

Основной биологической ролью АХЭ следует считать ее участие в

процессе передачи нервного импульса в холинергические синапсы нервной системы. При достижении потенциала действия пресинаптической мембраны происходит активация биохимических механизмов, в результате действия которых, везикулы с ацетилхолином, расположенные вблизи пресинаптической мембраны, сливаются с ней, в результате чего медиатор высвобождается в синаптическую щель. На постсинаптической мембране также имеются рецепторы ацетилхолина, которые подразделяются на 2 типа: никотиновые (НХР) и мускариновые (МХР) [Нейрохимия: учебное пособие ..., с. 54].

Локализация АХЭ располагается в синаптической щели, где белок закрепляется на базальной мембране. Также АХЭ обнаруживается на пресинаптической и постсинаптической плазматических мембранах. Изоформы АХЭ различаются от расположения и метода заякоривания фермента. На плазматической мембране АХЭ заякоривается при помощи PRiMA-субъединицы (Proline-Rich Membrane Anchor - пролин-содержащий мембранный якорь) [Perrier, Massoulié, Krejci, p. 275-285], а на базальной мембране — при помощи нитей белка коллагена Q (ColQ) [Henny, Jones, p. 654-670]. При этом PRiMA АХЭ обычно не так многочисленна в нервно-мышечном синапсе и, в основном, распространена в центральной нервной системе, но синтез этой изоформы может индуцироваться физическими нагрузками.

АХЭ, сконцентрированная на базальной мембране, представляет собой асимметричный фермент, состоящий из гомотетрамеров глобулярных каталитических субъединиц, прикрепленных к коллагеновому хвосту [Perrier, Massoulié, Krejci, p. 275-285]. Коллагеновый хвост сформирован тремя спирально переплетенными коллагеноподобными нитями, которые кодируются одним геном ColQ [Henny, Jones, p. 654-670]. В нем могут наблюдаться мутации, которые приводят в миастенических синдромах из-за недостаточности АХЭ в синаптических щелях.

АХЭ — высокоактивный фермент; за счет высокой скорости гидролиза (4000 молекул АХ в секунду) и особого расположения каталитических центров фермента относительно АХР, индивидуального для каждого синапса, АХЭ

крайне эффективно расщепляет медиатор. Активный центр 19 фермента представлен каталитической триадой остатков аминокислот — серина, гистидина и глутаминовой кислоты. Принято считать, что активный центр АХЭ представляет собой эстеразный и анионный пункты, при этом первый осуществляет непосредственно расщепление эфирной связи, в то время как второй присоединяет головку холина.

Также в структуре АХЭ можно выделить периферический анионный пункт, отвечающий за ингибирование субстратом, а также за неконкурентное ингибирование АХЭ. В мозгу АХЭ может колокализироваться с бетаамилоидными бляшками [Morán, Mufson, Gómez-Ramos, p. 362-369] и, более того, выполнять роль шаперонов бета-амилоида, агрегируя этот белок на периферическом анионном пункте (Reyes et al., 2004).

Ацетилхолиновый мускариновый рецептор (м-холинорецептор) представляет собой класс серпентиновых рецепторов, которые передают сигнал через гетеротримерные G-белки [Хухо, с. 158].

Мускариновые рецепторы — метаботропные рецепторы, ассоциированные с G-белками. Они не образуют поры для прохождения ионов, запуская, однако, каскад внутриклеточных реакций через систему вторичных посредников. Известно 5 подтипов мускариновых рецепторов (M1-M5), различающихся по типу G-белка, функции и локализации, а также действию антагонистов и блокаторов [Hulme, Birdsall, Buckley, p. 633-673]

Мускариновые рецепторы активируются мускариновыми и блокируются атропином. В нейромышечных синапсах присутствуют только никотиновые рецепторы. Мускариновые рецепторы обнаруживаются в мышечных и железистых клетках и, наряду с никотиновыми, в нервных ганглиях и нейронах центральной нервной системы.

Мускариновый рецептор любого типа состоит из одной полипептидной цепи длиной 440-540 аминокислотных остатков, с внешним N-концом и внутриклеточным C-концом [Петров, Харламова, Никольский, с. 165].

Ацетилхолин связывается с определенным участком, который расположен

в складке, образованной спирально скрученными трансмембранными доменами. Аспартатный остаток в третьем трансмембранном домене участвует в ионном взаимодействии с четвертичным азотом ацетилхолина, в то время как последовательности остатков тирозина и треонина, расположенные в трансмембранных сегментах примерно на одной трети расстояния от поверхности мембраны, образуют водородные связи с мускарином и его производными. Мускариновые рецепторы, кроме того, содержат участок (или участки), которые регулируют реакцию рецептора на большое количество соединений, в частности галамина, что снижает степень диссоциации холинергических лигандов [Страйер, с. 250].

Таким образом, эти рецепторы участвуют в передаче и модуляции таких парасимпатических эффектов, как сокращение гладких мышц, расширение сосудов, снижение частоты сердечных сокращений и усиление секреции в железах.

Мускариновые рецепторы способны изменять активность клеток, на которых они расположены, используя большое количество путей передачи сигнала. Активация биохимических путей передачи нервного импульса происходит в зависимости от природы и количества подтипа рецептора, эффекторных молекул, а также протеинкиназ, которые экспрессируются в этой ткани и возможности взаимного влияния между разными цепями передачи нервных сигналов [Tougu, p. 159].

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (н-холинорецептор) – это такой подтип рецепторов ацетилхолина, который делает возможным передачу нервного импульса через синапсы и активируется никотином (кроме ацетилхолина). Этот рецептор входит в группу рецептор-ионных каналов.

Никотиновые рецепторы являются ионотропными и ассоциированы с каналом, проницаемым для катионов, в частности натрия (Raftery et al., 1980). Для их активации и открытия канала необходимо связывание молекул ацетилхолина со специфическими участками на рецепторе; после открытия канала ионы натрия по градиенту концентрации устремляются в

постсинаптическую клетку и вызывают в ней локальную деполяризацию мембраны, то есть возбуждающий постсинаптический потенциал. Кроме постсинаптических nAХР существуют и ауторецепторы на пресинаптической клетке, активация которых регулирует синаптическую передачу, в частности, оказывает влияние на выброс ацетилхолина [Presynaptic membrane receptors..., p. 543-554].

Данный рецептор найден в химических синапсах в центральной и в периферической нервной системе, в нервно-мышечных синапсах, эпителиальных клетках большинства видов животных.

Основной участок связывания агониста ацетилхолина расположен на наружнойклеточной поверхности каждой из α -субъединиц, рядом с сегментом М1, и окружен двумя соседними остатками цистеина; для образования функционального участка связывания, эти остатки цистеина должны быть объединены дисульфидным мостиком между составляющими их атомами серы. Кроме того, для связывания ацетилхолина важным (но не всегда критическим) фактором является присутствие остатков тирозина и триптофана на данном участке [Cholinergic mechanism ..., p. 541].

Роль АХЭ в обеспечении нормального функционирования синапса значительна, соответственно, как патологические процессы, нарушающие функцию этого белка, так и антиАХЭ препараты, изменяющие его активность, способны оказывать большое влияние на нервно-мышечную передачу. Однако при нормальных, не патологических условиях, также может осуществляться регуляция активности АХЭ при помощи эндогенных механизмов

Несмотря на различия в механизме действия, холиномиметические и антихолинэстеразные вещества, оказывая влияние как на м-холинореактивные, так и на н-холинореактивные системы, вызывают в организме очень сходные изменения. Под влиянием антихолинэстеразных веществ наблюдается спазм аккомодации, сужение зрачка и понижение внутриглазного давления, что и составляет основную ценность этих препаратов для практической медицины. Помимо этого, некоторые препараты указанной группы (прозерин) применяются

для усиления сократительной деятельности матки в родах. Полагают, что ацетилхолин играет большую роль в осуществлении сократительной деятельности матки. Антихолинэстеразные вещества, инактивируя холинэстеразу, тем самым способствуют усилению действия тканевого ацетилхолина [Петров, Харламова, Никольский, с. 162].

Эзерин и прозерин являются антагонистами некоторых курареподобных препаратов с конкурентным типом действия, применяемых при наркозе для расслабления скелетной мускулатуры. Антихолинэстеразные вещества используют как антидоты в условиях передозировки или для купирования действия курареподобных препаратов. Инактивируя фермент холинэстеразу, они способствуют накоплению ацетилхолина у окончаний двигательных нервов и восстановлению нервно-мышечной проводимости, нарушенной введением курареподобных средств. Структура молекулы прозерина и эзерина представлена на рис.1.

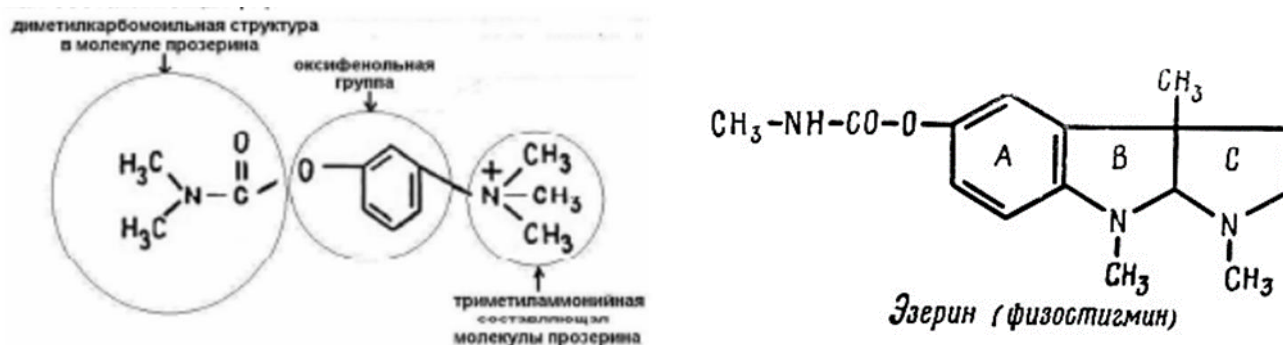


Рис.1. Структура молекулы прозерина и эзерина

В зависимости от того, как антихолинэстеразные препараты взаимодействуют с ацетилхолинэстеразой, их делят на вещества обратимого и необратимого действия. К обратимым относятся эзерин, прозерин и др.; к веществам необратимого действия - фосфакол, зарин и др.

Прозерин является ингибитором, способным инактивировать активный центр при карбамоилировании гидроксильной группы серина. В структуру прозерина входят диметилкарбамонильная структура, оксифенольная группа и триметиламмонийная составляющая [Сравнение окислительной ..., с. 77-81].

Фенольное кольцо оксифенольной группы играет роль ловушки свободных радикалов, при этом вызывая замедление окисления липидов тканей печени, приводя к проявлению антиоксидантного эффекта. Кислород оксифенольной и диметилкарбонильной структур выступает в качестве донора электронов, тем самым предполагая появление у прозерина прооксидантных свойств.

Взаимодействуя с холинэстеразой, лишает фермент способности гидролизовать медиатор ацетилхолин. Вследствие чего он накапливается в достаточных количествах, чтобы вызвать возбуждение органов. Способен оказывать влияние на периферические системы. Облегчение нервно-мышечной передачи происходит вследствие действия прозерина на Н-холинорецепторы, проявляется никотиноподобный эффект. Улучшается синаптическая проводимость и устраняется синаптический блок [Мещерягина, Россик, с. 41-45].

Прозерин плохо проникает сквозь гематоэнцефалический барьер, но при этом легко всасывается в кровь и проникает в мозг [Машковский, с. 845]. Прозерин в кишечнике, возможно, плохо всасывается или подвергается в значительной степени разрушению, вследствие чего терапевтическая доза прозерина при приеме внутрь значительно больше, чем при парентеральном введении.

Прозерин по сравнению с эзерином обладает более выраженным избирательным действием на н-холинореактивные системы скелетных мышц. На другие холинореактивные системы прозерин действует слабее [Биохимия человека, с. 108].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на базе лаборатории биохимии кафедры анатомии и физиологии человека и животных Тюменского государственного университета в 2020-2022 учебном году.

2.1. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили крысы линии Вистар. Содержались животные в виварии на полноценной диете.

В ходе работы все крысы были поделены на четыре группы: 1 – контрольная; 2 – подвергнута действию стресса с физической нагрузкой (40 минутное плавание в воде при температуре 28 градусов, с грузом на хвосте 3,5% от массы тела); 3 – подвергнута действию стресса после предварительной обработки антихолинэстеразным препаратом прозерином в концентрации 0,08 мг/кг массы тела; 4 – подвергнута действию физической нагрузки после инъекции антихолинэстеразного препарата – эзерина в концентрации 0,15 мг/кг массы тела.

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ

Конъюгирующая активность GST определялась при помощи субстрата 1-хлор-2,4-динитробензол (ХДНБ) по накоплению продуктов реакции конъюгации (GS-2,4-динитробензола). Далее проводилось измерение оптической плотности реакционной смеси.

Для определения активности глутатион-S-трансферазы в различных тканях, были приготовлены следующие реактивы: 1 – 0,1М К-фосфатный буфер рН 6.5; 2 – 10 мМ раствор, восстановленного глутатиона в буфере (1 мг глутатиона на 2 мл буфера); 3 – 0,1 М ХДНБ в этаноле (3 мг ХНДБ на 1 мл этанола). Реакционная смесь содержала: 27 мл реактива 1 + 1 мл реактива 2 + 1

мл реактива 3 (пять проб).

Были приготовлены гомогенаты из навески ткани коры головного мозга, печени и почек крыс. Из расчета 5 мл трис-НСl буфера (рН 7,5) на 1 грамм ткани. Для этого ткани гомогенизировали пять минут, а после двадцать минут центрифугировали на скорости 10000 обр/мин при температуре 4°C.

Далее в объеме 100 мкл каждой анализируемой пробы отбирался супернатант, и приливалась по 2,7 мл реакционная смесь. Оставшаяся надосадочная жидкость замораживалась для определения концентрации белка.

Время инкубации составляло 20 минут при температуре 27°C (на водяной бане). Затем реакция останавливалась 0,2 мл 1Н НСl.

Холостая проба содержала бидистиллированную воду вместо фермента. Контрольная проба готовилась из расчета на каждый гомогенат без инкубации, после добавления супернатанта приливался НСl. Оптическая плотность определялась при 340 нм против холостой пробы.

Далее подсчитывалась разность оптической плотности между пробой и контролем ΔЕ. Концентрация белка в пробах определялась по методу Лоури.

Полученные данные были обработаны с помощью методов вариационной статистики, сравнение показателей проводилось с использованием t-критерия Стьюдента.

1.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА МЕТОДОМ ЛОУРИ

Для определения концентрации белка были приготовлены следующие реактивы: 1 – реактив А: 2% раствор Na_2CO_3 в 0,1М NaOH; 2 – реактив Б: 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1% тринатрийцитрате; 3 – реактив В: 50 мл реактива А + 1 мл реактива Б; 4 – реактив Г: Коммерческий реактив Фолина Sigma[®] разведенный в 2 раза бидистиллированной водой.

В пробирки вносился анализируемый образец в количестве 0,5 мл. Далее приливался реактив В количеством 2,5 мл, смесь перемешивалась и выдерживалась при комнатной температуре в 10 минут. После в пробирки

вносился реактив Г в количестве 0,1 мл и выдерживался 30 минут при комнатной температуре.

Оптическая плотность определялась при длине волны 450 нм. Концентрация белка подсчитывалась с помощью калибровочного графика, построенного при помощи стандартного белка.

1.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДИЕНОВЫХ КОНЪЮГАТОВ

Определение концентрации диеновых конъюгатов производилось с помощью метода Стальной И.Д [Орехович, с. 63].

Навески коры больших полушарий мозга, печени, почек, эритроцитов и мембран эритроцитов крыс гомогенизировали в изопропанол-гептановой смеси один к одному (1 грамм ткани на 9 мл экстрагирующей смеси), после центрифугировали при скорости 7200 обр/мин в течение 10 минут. Отбирали надосадочную жидкость.

Далее к супернатанту приливалась бидистиллированная вода. Пробирки активно встряхивали несколько раз. Происходило расслоение пробы на фракции изопропил-вода-гептан. Верхняя гептановая фракция аккуратно отбиралась и разводилась этиловым спиртом 1:8.

Контрольная проба содержала изопропанол-гептановую смесь. Оптическая плотность измерялась при длине волны 232 нм против контрольной пробы.

Полученные данные были обработаны с помощью методов вариационной статистики, сравнение показателей проводилось с использованием t-критерия Стьюдента.

1.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА

Для определения концентрации малонового диальдегида в различных тканях были приготовлены реактивы: 1 – 0,025 М трис-НСl буфер рН 7,4

(содержит 0,175 М хлорида калия); 2 – 17% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ); 3 – 0,8% водный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК).

Навески ткани коры больших полушарий мозга, печени, почек, эритроцитов и мембран эритроцитов были прогомогенизированы в трис-НСI буфере (3 мл на 1 грамм ткани), а после отцентрифугированы при скорости 7200 об./мин в течение 10 минут.

Далее супернатант отбирался в пробирки в 0,5 мл. К нему приливали 2 мл ТХУ (для осаждения белка), и заново центрифугировали при скорости 7200 обр/мин в течении 10 минут. После чего в пробирки вносилось 2 мл супернатанта и 2,5 мл ТБК. Время инкубации составляло 10 минут на кипящей бане.

Контрольная проба содержала буферный раствор и ТБК, без супернатанта. Оптическая плотность измерялась при длине волны 532 нм [Орехович, с. 67].

Полученные данные были обработаны с помощью методов вариационной статистики, сравнение показателей проводилось с использованием t-критерия Стьюдента.

1.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ

Для определения активности каталазы различных тканях, готовились следующие реактивы: 1 - 0,1 М фосфатный буфер рН 7,5; 2 - 0,3% раствор пероксида водорода; 3 - 4% раствор молибдата аммония.

Готовили 10% гомогенат коры головного мозга крыс и 1% гомогенаты тканей печени и почек, для этого навески ткани гомогенизировали в 0,1 М фосфатном буфере в течение 5 минут. После центрифугировали на скорости 7 200 обр/мин. Отбирали супернатант.

В опытные пробирки вносили 2 мл 0,3% пероксида водорода, после чего вносили 100 мкл супернатанта, время инкубации составляло 10 минут, после чего реакция останавливалась внесением 1 мл молибдата аммония в пробы, при этом пробирки интенсивно встряхивали.

Контрольная проба содержала дистиллированную воду вместо 0,3% раствора пероксида водорода.

Холостая проба не содержала супернатанта (100 мкл дистиллированной воды). Определение оптической плотности проводили против контрольной пробы при длине волны 532 нм.

Полученные данные были обработаны с помощью методов вариационной статистики, сравнение показателей проводилось с использованием t-критерия Стьюдента.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Во время действия стресса на организм происходит образование молекул активных форм кислорода, что, в свою очередь, способствует увеличению продукции свободно радикальных и перекисных соединений токсичных для организма. Существует ряд веществ-маркеров, по изменению концентрации которых, можно судить об интенсификации окислительного стресса.

Одним из классических маркеров окислительного стресса является аскорбиновая кислота и ее фракции. Во время действия стресса отмечается снижение концентрации аскорбиновой кислоты в надпочечниках животных, участвующих в реализации общего адаптационного синдрома. Это связано с тем, что аскорбиновая кислота участвует в синтезе катехоламинов и является кофактором фермента дофамин- β -гидроксилазы в реакции преобразования дофамина в норадреналин. Концентрации катехоламинов и аскорбиновой кислоты взаимозависимы друг от друга. Результаты, полученные при измерении концентрации аскорбиновой кислоты и ее фракции, представлены на рисунке 2.

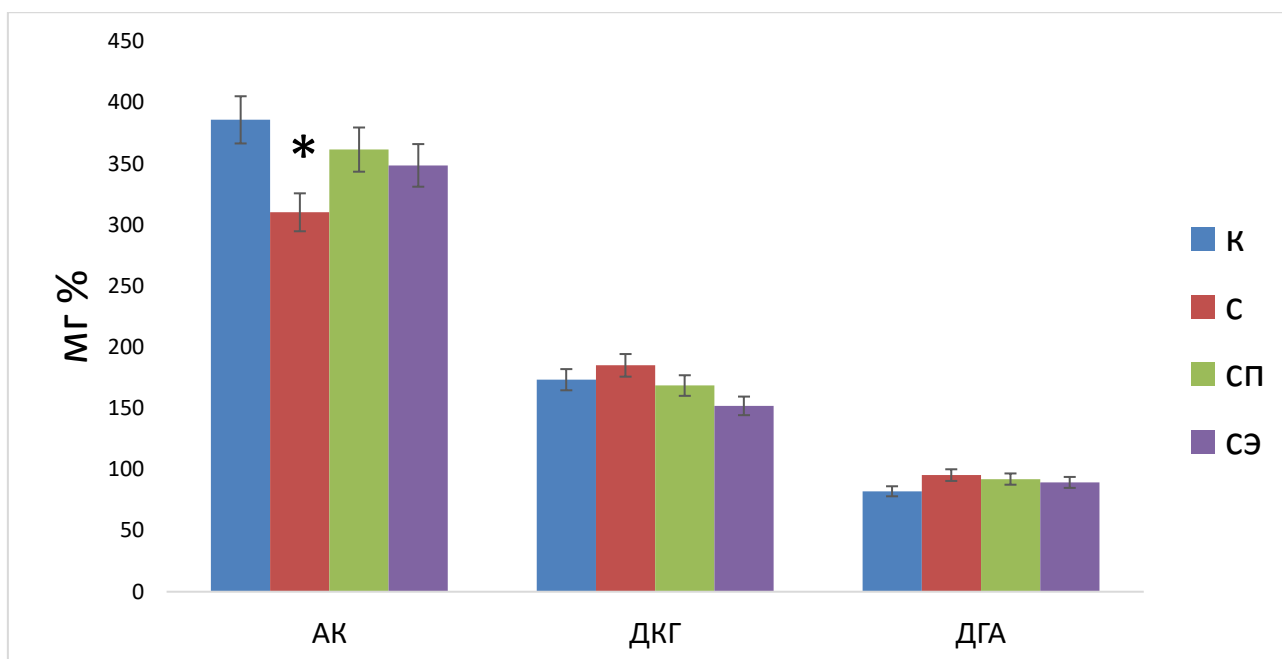


Рис.2. Концентрация аскорбиновой кислоты и ее фракций в смешанной мембранной фракции надпочечников

примечание: * - различия с контролем статистически достоверны при $p < 0,05$.

АК – восстановленная форма аскорбиновой кислоты; ДАК – дегидроаскорбиновая кислота; ДКГК – дикетогулоновая кислота; К – контрольная группа; С – группа животных, подвергнутых стрессу; СП – группа животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных антихолинэстеразным препаратом.

В результате перекисной деградации фосфолипидов происходит появление молекул диеновых конъюгатов, повреждающих липопротеиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты. Изменение концентрации диеновых конъюгатов говорит об интенсификации процессов ПОЛ, является маркером окислительного стресса [Писарева, Власов, Орлова, с. 217-226]. Результаты, полученные при измерении содержания диеновых конъюгатов в различных тканях крыс, представлены на рисунке 3.

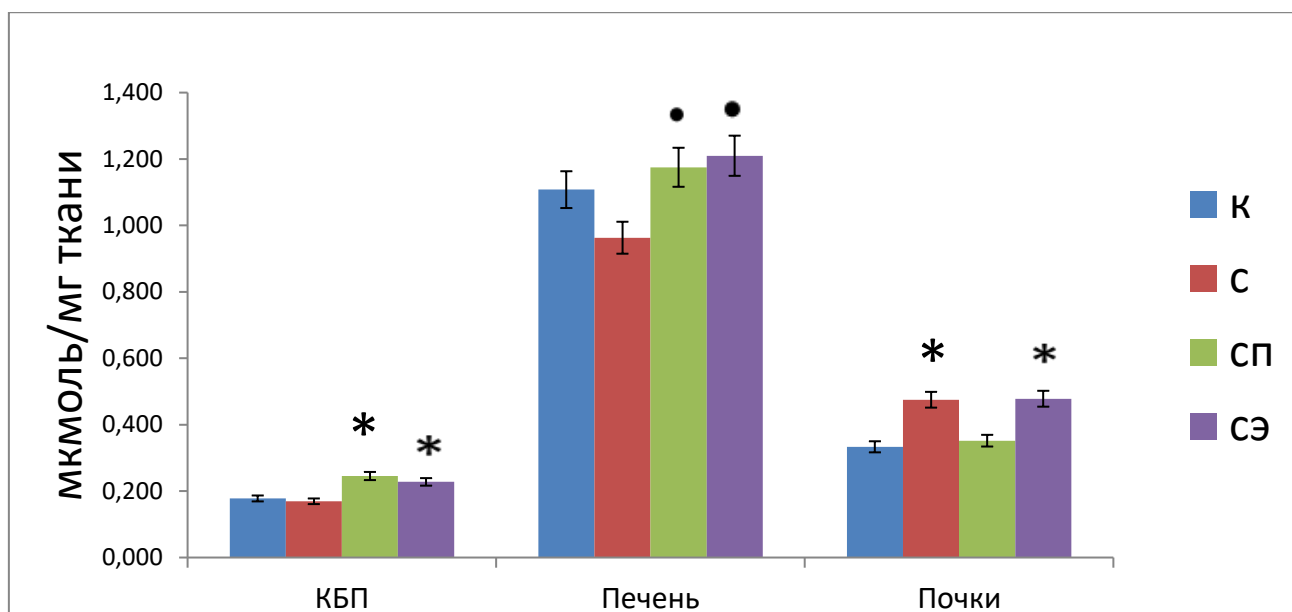


Рис.3. Содержание диеновых конъюгатов в смешанной мембранной фракции различных тканей крыс.

примечание: * - различия с контролем статистически достоверны при $p < 0,05$, • - различия со стрессом статистически достоверны при $p < 0,05$

К – контрольная группа; С – группа животных, подвергнутых стрессу; СП – группа животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных прозеринном; СЭ – группа животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных эзеринном.

В ходе исследования было отмечено увеличение концентрации диеновых конъюгатов в смешанной мембранной фракции почек крыс, подвергнутых стрессу, а также обработанных антихолинэстеразным препаратом эзеринном. Отмечено увеличение концентрации диеновых конъюгатов в коре больших полушарий головного мозга группы животных, подвергнутых действию физической нагрузки после введения антихолинэстеразного препарата – прозерина и эзерина, в сравнении с контрольной группой животных. Также статистически доказано увеличение концентрации диеновых конъюгатов в смешанной мембранной фракции печени группы животных, подвергнутых действию стресса, после обработки антихолинэстеразными препаратами в сравнении со стрессом. Согласно литературным данным повышенная концентрация первичных продуктов перекисного окисления липидов обусловлена увеличением уровня АФК в клетках [Изменение продуктов..., с. 61-

67]. Происходит рост количества НЖК и молекулярного кислорода в тканях, отмечается снижение МДА, что подтверждается результатами, представленными на рисунке 3.

Во время перекисного окисления липидов происходит выделение множества цитотоксических продуктов. В ходе роста радикальной цепи за счет присоединения кислорода, образуются вторичные продукты ПОЛ, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой. Происходит образование малонового диальдегида. МДА представляет собой конечный продукт окислительной деградации липидов, является промежуточным продуктом ферментативного окисления арахидоновой кислоты. Результаты, полученные при измерении содержания малонового диальдегида в различных тканях крыс, представлены на рисунке 4.

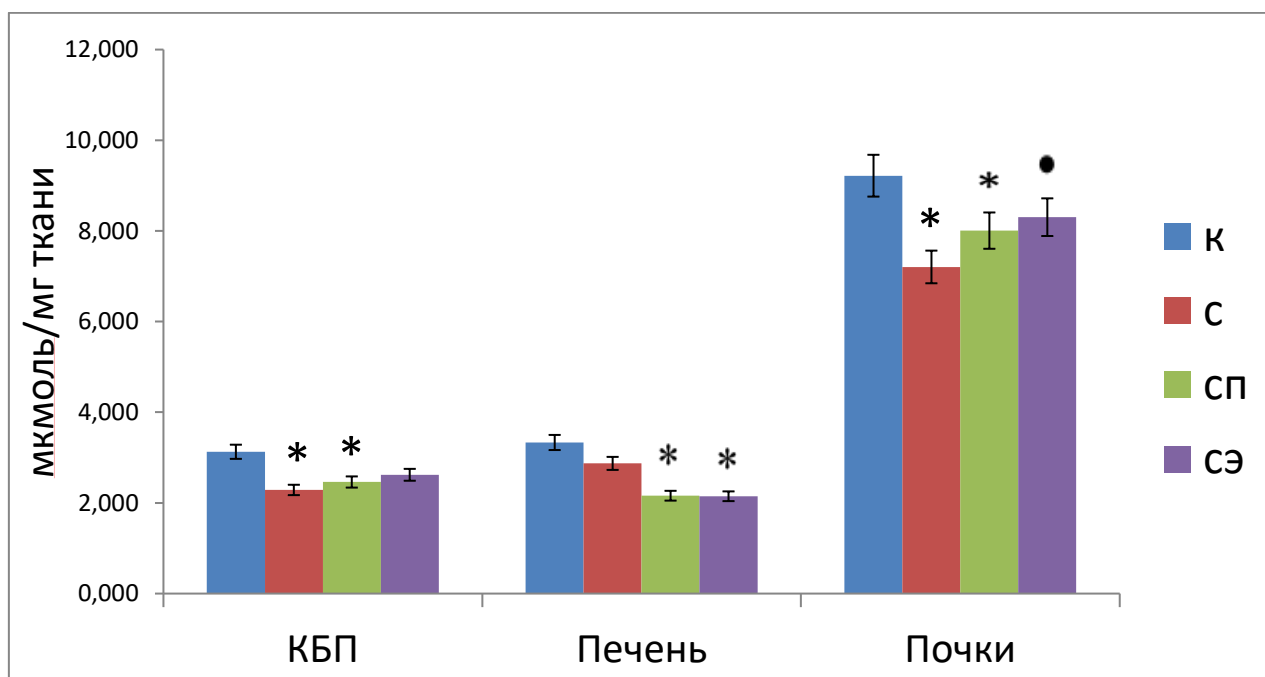


Рис.4. Содержание малонового диальдегида в смешанной мембранной фракции различных тканей крыс.

примечание: * - различия с контролем статистически достоверны при $p < 0,05$, • - различия со стрессом статистически достоверны при $p < 0,05$

К – контрольная группа; С – группа животных, подвергнутых стрессу; СП – группа животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных прозеринном; СЭ – группа животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных эзеринном.

В результате исследования нами не было обнаружено роста концентрации

малонового диальдегида, более того было обнаружено снижение концентрации МДА в смешанной мембранной фракции коры больших полушарий головного мозга опытных животных всех групп (подвергнутых действию стресса; подвергнутых действию стресса после введения прозерина; подвергнутых действию стресса после введения эзерина) по сравнению с контролем. Также отмечено снижение этого показателя в почках животных, подвергнутых действию физической нагрузки, а также в группе животных, подвергнутых стрессу после предварительной обработки эзеринном, в сравнении с контрольной группой животных.

Можно отметить, что это хорошо согласуется с данными, полученными при измерении концентрации первичных продуктов перекисного окисления, результаты измерения концентрации которых, представлены на рисунке 2. Нами отмечено увеличение ДК и снижение концентрации МДА, что, согласно литературным данным, указывает на кратковременное действие стресса на организм. Присутствует лишь стадия тревоги, во время которой происходит повышенное образование АФК. Повышение первичных продуктов ПОЛ компенсируется снижением промежуточных (МДА), и является результатом повышения активности ферментов АОС [Сурина-Марышева, с. 86-87].

Вторым этапом детоксикации, реализующимся в клетках, является реакция конъюгации ксенобиотиков и их реакционноспособных метаболитов с глутатионом. Глутатион-S-трансфераза выполняет важную роль в поддержании внутриклеточного гомеостаза, влияет на резистентность клетки к различным воздействиям, восстанавливает органические гидропероксиды и участвует в метаболизме конечных цитотоксичных продуктов перекисного окисления липидов. Результаты, полученные при измерении активности глутатион-S-трансферазы в различных тканях крыс, представлены на рисунке 5.

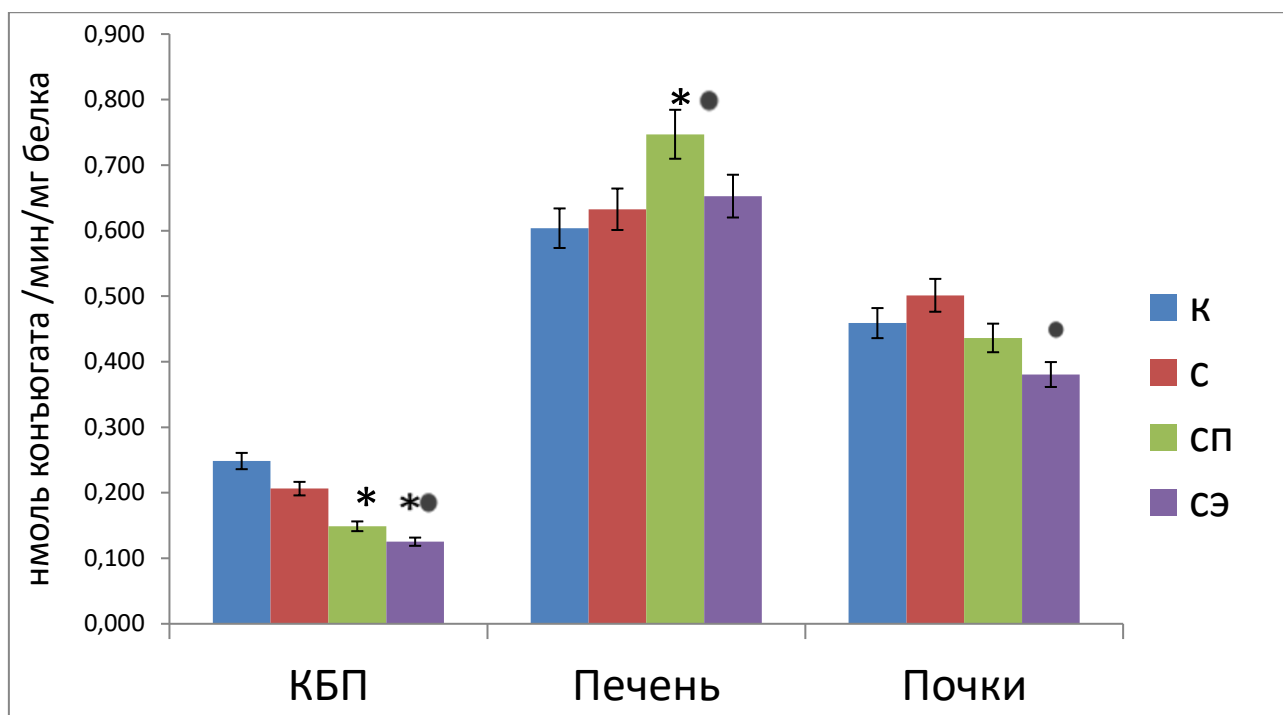


Рис.5. Активность глутатион-S-трансферазы в различных тканях крыс.

примечание: * - различия с контролем статистически достоверны при $p < 0,05$, • - различия со стрессом статистически достоверны при $p < 0,05$.

К – контрольная группа; С – группа животных, подвергнутых стрессу; СП – группа животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных прозеринном; СЭ – группа животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных эзеринном.

Исследование глутатион-S-трансферазы показало увеличение активности фермента в смешанной мембранной фракции печени у двух опытных групп животных, подвергнутых стрессу с предварительной обработкой антихолинэстеразными препаратами прозеринном и эзеринном, а так же уменьшение активности фермента в коре больших полушарий группы животных, обработанных антихолинэстеразными препаратами – прозеринном и эзеринном, в сравнении с контрольной группой животных. Из литературы известно, что в тканях печени наблюдается наибольшая концентрация глутатион-S-трансферазы, благодаря способности каждой молекулы белка связывать несколько лигандов, обеспечивающих эффективное поддержание гомеостаза гепатоцитов [Доценко, с. 39-46].

Из-за способности GST катализировать реакцию конъюгации

ксенобиотиков (прозерина и эзерина), проникновение препарата в клетки печени имеет высокое значение и может служить причиной повышения активности фермента в группе крыс, подвергнутых стрессу и обработанных антихолинэстеразными препаратами, по сравнению с контрольной группой крыс [Корик, Семак, с. 42-47].

Значимая роль в антиперекисной защите организма принадлежит супероксиддисмутазе. СОД выступает в роли катализатора в реакции диспропорционирования супероксидного анион-радикала. Перекись водорода, образовавшаяся в большом количестве во время этой реакции, обладает высокой токсичностью. Повышение активности супероксиддисмутазы указывает на интенсификацию процессов свободнорадикального окисления, что подтверждает развитие окислительного стресса.

Согласно данным, предоставленным на рисунке 6, Исследование активности супероксиддисмутазы выявило увеличение активности действия фермента в коре больших полушарий всех опытных групп животных, в сравнении с контрольной группой животных, а также в смешанной мембранной фракции печени групп животных, подвергнутых действию стресса после предварительной обработки препаратами прозеринном и эзеринном, в сравнении со стрессом.

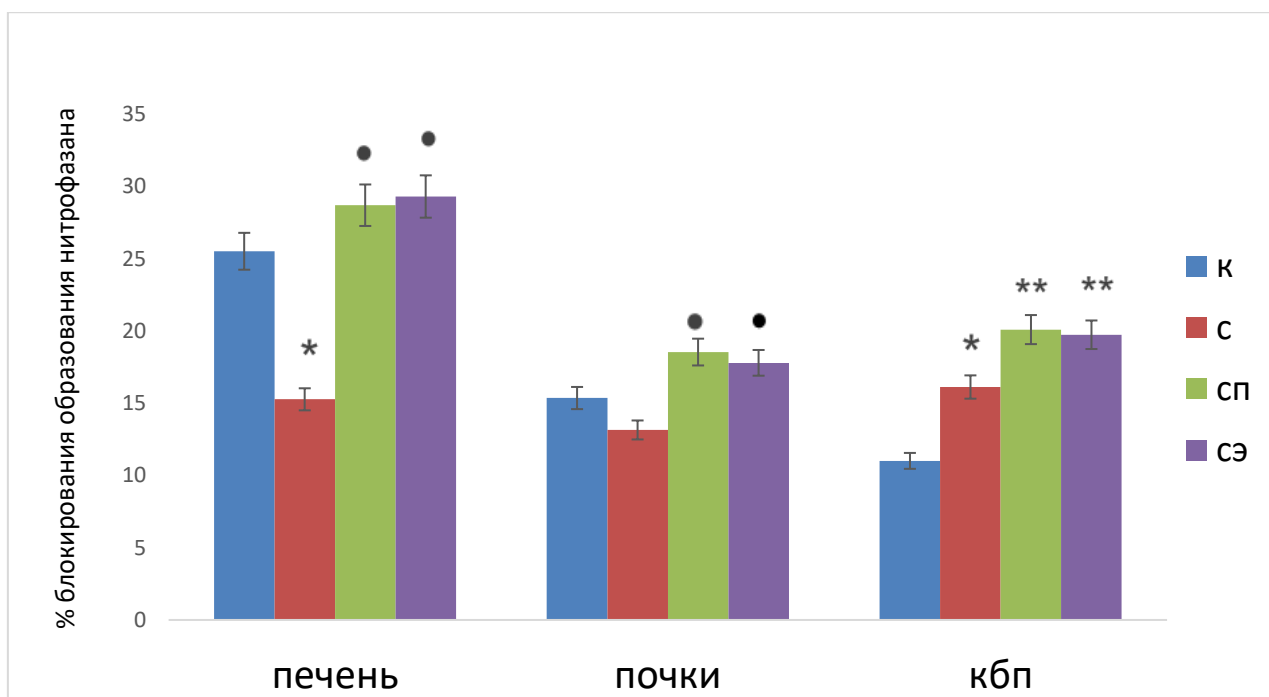


Рис.6. Активность супероксиддисмутазы в смешанной мембранной фракции различных тканей крыс

примечание: * - различия с контролем статистически достоверны при $p < 0,05$, ** - различия с контролем статистически достоверны при $p < 0,01$, • - различия со стрессом статистически достоверны при $p < 0,05$.

К – контрольная группа; С – группа животных, подвергнутых стрессу; СП – группа животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных прозеринном; СЭ – группа животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных эзеринном.

В литературных источниках приводятся различные данные по активности супероксиддисмутазы в тканях. Увеличение активности фермента во время действия стресса происходит за счет увеличения способности гомогенатов продуцировать активные формы кислорода [Влияние холодого стресса..., с. 22-25].

Перекись водорода, образовавшаяся в большом количестве во время окисления, обладает высокой токсичностью. Функция каталазы функция состоит в том, чтобы разлагать перекись водорода, образовавшуюся в процессе биологического окисления и накопленную в клетках до воды и кислорода. Повышение активности каталазы указывает на интенсификацию процессов свободнорадикального окисления, что подтверждает развитие окислительного

стресса.

В результате полученных данных по активности каталазы, нами статистически доказано изменение активности фермента в тканях обеих опытных групп крыс в сравнении с контрольной группой животных (таблица 1).

Таблица 1

Активность каталазы в смешанной мембранной фракции, полученной из различных тканей крыс ($M \pm m$, $n = 8$).

Ткани	К	С	СП	СЭ
КБП	$0,15 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,02^*$	$0,15 \pm 0,02 \bullet$	$0,16 \pm 0,02 \bullet$
Печень	$43,18 \pm 4,71$	$37,71 \pm 3,79$	$45,52 \pm 4,18 \bullet$	$47,99 \pm 4,34 \bullet$
Почки	$39,22 \pm 4,03$	$47,98 \pm 4,32^*$	$31,54 \pm 3,28^*$, ••	$23,89 \pm 2,55^*$, ••

примечание: * - различия с контролем статистически достоверны при $p < 0,05$

К – контрольная группа; С – группа животных, подвергнутых стрессу; СП – группа животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных прозеринном; СЭ – группа животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных эзеринном, • - различия со стрессом статистически достоверны при $p < 0,05$, •• - различия со стрессом статистически достоверны при $p < 0,01$

Исследование активности каталазы выявило повышение данного фермента в гомогенате печени и почек крыс, подвергнутых действию стресса, а также в смешанной мембранной фракции печени и коры больших полушарий у группы животных, подвергнутых действию стресса после предварительной обработки антихолинэстеразным препаратом прозеринном, в сравнении с контрольной группой животных, что указывает на интенсификацию процессов свободнорадикального окисления, что подтверждает развитие окислительного стресса. Так же выявлено снижение активности каталазы в тканях почек у

группы животных, подвергнутых действию физической нагрузки, после предварительной обработки препаратом прозерином, в сравнении с контрольной группой животных и снижение активности каталазы во всех тканях опытных групп крыс, подвергнутых стрессу после предварительной обработки антихолинэстеразными препаратами, в сравнении со стрессом. Данное явление указывает на то, что могла возникнуть гипоксия, повлиявшая на замедление активности каталазы [Нестеров, Чумакова, Теплый, с. 75-83]. Так как изменение активности каталазы имеет различный характер. Это может указывать на то, что в данных условиях в клетках имеются другие механизмы инактивации супероксидных радикалов. А именно, при снижении активности каталазы происходит повышение активности супероксиддисмутазы относительно контрольной группы, и наоборот, происходит перекрестная регуляция активности [Доценко, Мищенко, с. 107-113]. что указывает на то, что в данных условиях в клетках имеются другие механизмы инактивации супероксидных радикалов. А именно, при снижении активности каталазы происходит повышение активности супероксиддисмутазы относительно контрольной группы, и наоборот, происходит перекрестная регуляция активности. Результаты приведены в таблице 1.

ВЫВОДЫ

1. Исследование концентрации диеновых конъюгатов у животных, подвернутых действию стресса, выявило увеличение данного показателя только в смешанной мембранной фракции почек. Влияние антихолинэстеразных препаратов выражалось, в целом, в увеличении показателя по сравнению с группой «стресс».

2. В ходе исследования концентрации малонового диальдегида было установлено снижение его содержания в смешанной мембранной фракции всех изучаемых тканей у опытных групп животных, в сравнении с контрольной группой.

3. Исследование глутатион-S-трансферазы выявило разнонаправленные изменения активности данного фермента. Можно отметить, что действие антихолинэстеразных препаратов в тканях коры больших полушарий и почек приводило к уменьшению активности данного фермента, а в тканях печени к увеличению, в сравнении с группой «стресс».

4. Активность СОД под действием стресса в смешанной мембранной фракции почек и КБП изменялась разнонаправлено. Действие антихолинэстеразных препаратов приводило к выявлению более высоких значений активности фермента по сравнению с группой стресс.

5. Отмечен рост активности каталазы в смешанной мембранной фракции почек и коры больших полушарий головного мозга крыс. Коррекция стресс-реакции антихолинэстеразными препаратами приводила к тому, что активность фермента была не отличимая от контрольных величин.

6. Отмечено, что оба антихолинэстеразных препарата, применённых в условиях стресса, приводят к усилению процессов свободно радикального окисления биологических макромолекул преимущественно в коре больших полушарий головного мозга крыс.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Boon E., Downs A., Marcey D. Proposed Mechanism of Catalase. Catalase: H₂O₂: H₂O₂ Oxidoreductase: Catalase Structural Tutorial. Retrieved // *Physiol Rev.* 2007. №2. Pp. 35–38.
2. Chelikani P., Fita I., Loewen P.C. Diversity of structures and properties among catalases // *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences.* 2004. Vol. 61. Pp. 192–208.
3. Cholinergic mechanism function and dysfunction / Silman I., Michaelson D.M., Fisher A. [et al] // London: CRC Press, 2004. 774 p.
4. Crow J.P. Catalytic antioxidants to treat amyotrophic lateral sclerosis // *Expert Opin Investig Drugs.* 2006. Vol. 15, №11. Pp. 1383–1393.
5. Dunant Y., Gisiger V. Ultrafast and slow cholinergic transmission. Different involvement of acetylcholinesterase molecular forms // *Molecules.* 2017. №22 (8). P. 1300.
6. Eaton D., Bammler T. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology // *Toxicol Sci.* 1999. №42. Pp. 156-164.
7. Hulme E.C., Birdsall N.J., Buckley N.J. Muscarinic receptor subtypes // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 1990. Vol. 30. P. 633-673
8. Ighodaro O.M., Akinloye O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid // *Alexandria Journal of Medicine.* 2018. Vol. 54, №4. Pp. 287–293.
9. Moran M.A., Mufson E.J., Gómez-Ramos P. Colocalization of cholinesterases with beta amyloid protein in aged and Alzheimer's // *Acta Neuropathologica.* 1993. Vol. 85(4). P. 362-369.
10. Melov S. Animal models of oxidative stress, aging and therapeutic antioxidant interventions // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003. Vol. 34. Pp. 1395–1400.
11. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling / Wang Y., Branicky R., Noll A., Hekimi S. // *Journal of Cell*

Biology. 2018. Vol. 217, № 6. Pp. 1915–1928.

12. Picciotto M.R., Higley M.J., Mineur Y.S. Acetylcholine as neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior // *Neuron*. 2012. №76 (1). Pp. 116-129.

13. Presynaptic membrane receptors in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse / J. Tomàs, M. M. Santafé, N. Garcia [et al] // *Journal of Neuroscience Research*. 2014. Vol. 92 (5). P. 543-554.

14. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges // *Analytical Biochemistry*. 2017. Pp. 13–30.

15. Tougu V. Acetylcholinesterase: Mechanism of catalysis and inhibition. A review // *CurrMedChem*. 2001. Vol.1. Pp. 155–170.

16. Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression // *Free Radical Biology & Medicine*. 2002. Vol. 33. № 3. Pp. 337–349.

17. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / Донцов В.И., Крутько В.Н., Мрикаев Б.М., Уханов С.В. // *Труды ИСА РАН*. 2006. Т 19. С. 50–69.

18. Александрова Э.Б. Процессы перекисного окисления липидов и показатели функций антиоксидантной системы при СВЧ-воздействии различной интенсивности // *Вестник новых медицинских технологий*. 2014. №1. С. 1–7.

19. Биоантиоксиданты / Гудков С.В., Брусков В.И., Куликов А.В. [и др.] // *Альманах клинической медицины*. 2014. №34. С. 61–65.

20. Биохимия человека: в 2-х томах, т.1., пер. с англ. / Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. // М.: Мир, 1993. 384 с.

21. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // *Соровский образовательный журнал*. 2000. Т. 6, №12. С. 13–19.

22. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // *Успехи биологической химии*. 2009. Т. 49. С.

1–49.

23. Влияние холодового стресса на интенсивность перекисного окисления липидов и антиоксидантную систему тканей экспериментальных животных / Шаповаленко Н.С., Доровских В.А., Коршунова Н.В. [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2011. №39. С. 22–25.

24. Волыхина В.Е., Шафрановская Е.В. Супероксиддисмутаза: структура и свойства // Вестник ВГМУ. 2009. Т. 8, №4. С. 1–18.

25. Воскресенский О.Н., Левицкий А.П. Перекиси липидов в живом организме // Вопросы медицинской химии. 2003. Т. 16, №6. С. 563–583.

26. Габитова Д.М., Рыжикова В.О., Рыжикова М.А. Антиоксидантная защитная система организма // Башкирский химический журнал. 2006. Т. 13, №2. С. 94–96.

27. Гаврилова О.А. особенности перекисного окисления липидов в норме и при некоторых патологических состояниях у детей // Acta biomedica scientifica. 2017. Т. 2, №4. С. 15–22.

28. Геворкян В.С. Геворкян И.С. Современные исследования воздействия различных стресс-факторов на крыс и мышей // Электронное научное издание Альманах Пространство и Время. 2017. Т. 15. №1. 9 с.

29. Гинзбург Е.Б., Соснова Е.А. Перекисное окисление липидов и развитие метаболического синдрома // Архив акушерства и гинекологии им В. Ф. Снегирева. 2015. №4. С. 36–37.

30. Доценко О.И. Активность системы глутатиона крови мышей, находящихся в условиях вибрационного стресса // Scientific Journal «ScienceRise». 2015. №11. С. 39–46.

31. Доценко О.И., Доценко В.А., Мищенко А.М. Активность супероксиддисмутаза и каталаза в эритроцитах и некоторых тканях мышей в условиях низкочастотной вибрации // Физика живого. 2010. Т. 18, №1. С. 107–113.

32. Зентов Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. М: Наука. 2001. 340 с.

33. Изменение продуктов и субстратных составляющих перекисного окисления липидов в ткани печени на фоне холодовой нагрузки и введении непрямых мускаринчувствительных и никотинчувствительных холиномиметиков / Тиханов В.И., Лосев Н.А., Доровских В.А. [и др.] // Бюллетень. 2013. №50. С. 61–67.

34. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов // Успехи биологической химии. 2014. Т. 54. С. 299–348.

35. Корик Е.О., Семак И.В. Окислительное повреждение глутатион-S-трансфераз печени крыс при взаимодействии с медью и билирубином // Вестник БГУ. 2008. Т. 2, №3. С. 42–47.

36. Кормош Н.Г. Физиологическая роль активных форм кислорода (субклеточный уровень) – взгляд клинициста // Российский биотерапевтический журнал. 2011. Т 10, № 4. С. 29–35.

37. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита // Соросовский образовательный журнал. 1999. №1. С. 2–7.

38. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона: синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // Биомедицинская химия. 2009. Т. 55, №3. С. 255–277.

39. Латюшин Я.В., Павлова В.И., Мамылина Н.В. Динамика антиоксидантных ферментов в костном мозге животных на фоне коррекции церулоплазмином при действии эмоционально-болевого и гипокинетического стресса // Вестн. ЧГПУ. 2009. №12. С. 319–326.

40. Маханова Р.С. К вопросу изучения перекисного окисления липидов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2011. Т.1, № 29–1. С.231–234.

41. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2014. 1216 с.

42. Мещерягина И.А., Россик О.С. Способ применения

антихолинестеразных препаратов в сочетании с методом прямой электростимуляции при нейропатиях периферических нервов // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2014. №3. С. 41–45.

43. Нейрохимия: учеб. пособие для вузов / Болдырев А.А., Ещенко Н.Д., Илюха В.А., Кяйвярайнен Е.И. М.: Дрофа, 2010. 398 с.

44. Нестеров Ю.В., Чумакова А.С., Теплый Д.Л. Изменение активности супероксиддисмутазы, каталазы и свободнорадикальных процессов в легочной ткани крыс разного постнатального возраста при тепловом стрессе // Архангельский медицинский журнал. 2016. Т. 11, №2. С. 75–83.

45. Новиков В.Е., Левченкова О.С., Пожилова Е.В. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция // Научные обзоры. 2014. Т. 12, №4. С. 13–21.

46. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1997. 391 с.

47. Петров К.А., Харламова А.Д., Никольский Е.Е. Холинэстеразы: взгляд нейрофизиолога // Гены & клетки. 2014. Т. 9, №3. С. 160–167.

48. Петров К.А., Харламова А.Д., Никольский Е.Е. Холинэстеразы: взгляд нейрофизиолога // Гены и клетки. 2014. Т. 9, № 3. С 160-167.

49. Писарева Ю.В., Власов М.Ю., Орлова Е.В. Влияние аллогенного гидроксиапатита на активность каталазы, уровень диеновых конъюгатов и малонового диальдегида у крыс // Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия. 2012. №9. С. 217–226.

50. Пожилова Е.В. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клеток // Вестник Смоленской государственной академии. 2015. Т. 14, №2. С. 13–22.

51. Северин Е.С. Биохимия, 2-е изд., испр. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 784с.

52. Состояние антиоксидантных систем при различных патологических состояниях организма / Бакуев М.М., Магомедов К.К., Шахбанов Р.К., Магомедов А.А. // Вестник ДГМА. 2012. №3. С.100–107.

53. Сравнение окислительной активности прозерина при кратковременной холодовой нагрузке *in vivo* и *in vitro* / Тиханов В.И., Лосев Н.А., Доровских В.А. [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2013. №49. С. 77–81.
54. Страйер Л. Биохимия: пер. с англ. в 3 т. Т. 3. М.: Мир, 1985. 400 с.
55. Сурина-Марышева Е.Ф. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов при иммобилизационном стрессе // ЮУрГУ. 2008. №4. С. 86–87.
56. Узбеков М.Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы // Социальная и клиническая психиатрия. 2014. Т. 24, №4. С. 97–103.
57. Фархутдинов Р.Р. Свободнорадикальное окисление: мифы и реальность // Башкирский государственный медицинский университет. 2006. Т.1, №1. С. 146–152.
58. Хныченко Л.К., Сапронов Н.С. Стресс и его роль в развитии патологических процессов // Научные обзоры. 2003. Т. 2, №3. С. 2–15.
59. Чанчаева Е.А., Айзаман Р.И., Герасев А.Д. Современное представление об антиоксидантной системе организма человека // Экологическая физиология. 2013. №7. С. 50–58.
60. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах // Успехи современного естествознания. 2006. №7. С. 29–36.