

АННОТАЦИЯ

с. 49, рис. 11, табл. 1, библи. 66.

Исследована концентрация продуктов перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной защиты. Показано, достоверное снижение концентрации аскорбиновой кислоты в надпочечниках у группы животных, подвернутых действию стресса в сравнении с контролем. Отмечено достоверное увеличение концентрации диеновых конъюгатов в препаратах тканей головного мозга и мембранных препаратах группы крыс, подвергнутых действию стресса и группе животных, подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразными препаратами. Отмечено достоверное увеличение активности антиоксидантных ферментов (каталаза, супероксиддисмутаза) в препаратах коры головного мозга крыс, подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразными препаратами.

Ключевые слова: головной мозг крыс, печень, почки, активность каталазы, антихолинэстеразный препарат, стресс, активность глутатион-S-трансферазы, диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид.

The concentration of lipid peroxidation products and the activity of antioxidant protection enzymes were studied. A significant decrease in the concentration of ascorbic acid in the adrenal glands was shown in a group of animals subjected to stress in comparison with the control group. There was a significant increase in the concentration of diene conjugates in preparations of brain tissue and membrane preparations of a group of rats exposed to stress and a group of animals exposed to stress and treated with an anticholinesterase drug. A significant increase in the activity of antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase) found out in the preparations of the cerebral cortex of rats exposed to stress and treated with an anticholinesterase drug.

Keywords: rat brain, liver, kidneys, catalase activity, anticholinesterase drug, stress, glutathione-S-transferase activity, diene conjugates, malone dialdehyde.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1.1. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА.....	7
1.2. АНТИПЕРЕКИСНАЯ ЗАЩИТА.....	10
1.2.1. КАТАЛАЗА.....	11
1.2.2. ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗА.....	12
1.2.3. СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА.....	14
1.3. ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ.....	15
1.4. ДИЕНОВЫЕ КОНЪЮГАТЫ.....	20
1.5. МАЛОНОВЫЙ ДИАЛЬДЕГИД.....	20
1.6. СТРЕСС.....	22
1.7. АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА И АНТИХОНИЭКСТЕРАЗНЫЕ ПРЕПАРАТЫ.....	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	31
2.1. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	31
2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ.....	31
2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ.....	32
2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДИЕНОВЫХ КОНЪЮГАТОВ.....	33
2.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА.....	34
2.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА МЕТОДОМ ЛОУРИ.....	35
ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	36
Выводы:.....	43
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	44

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- GSH – восстановленный глутатион
АДФ – аденозиндифосфат
АМФ – аденозинмонофосфат
АТФ – аденозинтрифосфат
АФК – активные формы кислорода
АХЭ – ацетилхолинэстераза
GST – глутатион-S-трансфераза
ДК – диеновые конъюгаты
КАТ – каталаза
КБП – кора больших полушарий
МДА – малоновый диальдегид
НАДН – никотинамидадениннуклеотид
НСТ – нитросиний тетразол
ПОЛ – перекисное окисление липидов
СОД – супероксиддисмутаза
ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота
ТХУ – трихлоруксусная кислота
ХДНБ – 1-хлор-2,4-динитробензол

ВВЕДЕНИЕ

В ответ на действие стресса в организме животных происходит повышенное образование активных форм кислорода, что может сопровождаться усилением процесса окисления биологических макромолекул. В ходе окисления биологических молекул образуются свободно радикальные и перекисные соединения, которые являются токсичными для клеток. Вместе с тем в клетках, млекопитающих представлены ферменты антирадикальной и антиперекисной защиты такие как глутатион-S-трансфераза, каталаза, действие которых направлено на предотвращение образования свободно-радикальных форм кислорода и накопления в клетках токсичных продуктов окисления. От того, насколько своевременно и адекватно происходит активация ферментов антиоксидантной защиты зависит оксидативный статус клеток и сохранение гомеостаза на клеточном и организменном уровнях.

Показателями уровня перекисного окисления липидов может служить накопление диеновых конъюгатов, которые являются продуктом окисления высших жирных кислот, и малонового диальдегида, который является конечным продуктом окисления. В связи с вышеизложенным нами была определена следующая основная цель исследования: оценить интенсивность перекисного окисления биологических макромолекул и активности ферментов антиоксидантной защиты в организме крыс, подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразными препаратами.

Для реализации поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Исследовать активность ферментов антиоксидантной защиты: глутатион-S-трансферазы, супероксиддисмутазы и каталазы в различных тканях крыс, подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразными препаратами.
2. Измерить количество первичных продуктов перекисного окисления жирных кислот: диеновых конъюгатов в различных тканях крыс, подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразными препаратами.

3. Измерить количество конечных продуктов перекисного окисления жирных кислот: малонового диальдегида в различных тканях крыс, подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразными препаратами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

Активные формы кислорода (АФК) объединяют под собой целый ряд соединений, образованных путем взаимодействия молекулы кислорода с органическими и неорганическими молекулами. Наиболее значимыми АФК считаются: супероксидный радикал, гидроксильный радикал, перекись водорода, пероксидный ион, гипохлорит. АФК в организме животных выполняют роль сигнальных молекул и их присутствие в живых клетках необходимо, однако при увеличении концентрации этих соединений они способны вызывать разрушение и повреждение клеток. Генерация активных форм кислорода происходит в основном в митохондриях и микросомах под действием ферментов класса оксигеназ. Нарушение работы этих ферментов или низкие концентрации АДФ приводят к избыточному накоплению АФК в живых клетках [Митохондрии как источники..., с. 116-123].

В клетках живых организмов выделяют несколько путей образования АФК. Первый путь — это работа электрон-транспортных цепей мембран митохондрий и микросом, так, например, накапливается супероксидный радикал. [Осипов, Азизова, Владимиров, с. 180] Второй путь реализуется по средствам работы ферментов и обеспечивает накопление в клетках перекиси водорода. Аутоокисление биологических молекул, таких как гемоглобин, восстановленный глутатион, биогенные амины обуславливают третий путь образования АФК [Владимиров, с. 43].

Активированная молекула кислорода предоставляет собой супероксидный радикал, который образуется путем присоединения электронов на внешний электронный уровень одного из атомов кислорода в молекуле. Из-за наличия дополнительного электрона молекула обладает высокой химической активностью, что влечет за собой начала каскадного механизма образования АФК, но и старт процесса перекисного окисления липидов.

В некоторых типах клеток супероксидный радикал выполняет биологически важные функции. Так например в фагоцитах – клетках иммунной защиты организма – синтезируется для борьбы с антигенами, ведь благодаря своей высокой химической активности достаточно хорошо окисляет биологические мембраны, нарушая их структуру, а при взаимодействии с белками и рецепторами ведет к изменениям их нативной структуры и понижению их активностей или полного прекращения выполнения их функций, что ведет за собой нарушение работы клеток-антигенов [Дубинина, с. 3].

Одним из путей накопления в клетках пероксида водорода является реакция дисмутации, протекающая как в присутствии фермента супероксиддисмутаза, так и в ее отсутствии, то есть неферментативно. Супероксиддисмутаза является высокоспецифичным ферментом, который ускоряет протекание реакции дисмутации. В результате данной реакции в клетках образуется молекула кислорода и молекула воды, при этом нейтрализуются два супероксидных радикала двумя протонами [Осипов, Якутова, Владимиров, т. 3, с 390; Okado-Matsumoto, V 276, p. 38388].



Пероксид водорода не является свободным радикалом, а является достаточно стабильной молекулой. Он не способен запускать каскадный механизм образования свободных радикалов, однако в клетках он воспринимается как молекула воды, что обуславливает ее передвижение в ткани. Разложением пероксида водорода в клетках занимается фермент – каталаза. Этот фермент катализирует реакцию разложения пероксида водорода на молекулу воды и молекулу кислорода. Повышение концентрации H_2O_2 наблюдается при запуске процессов, сопровождающихся выработкой супероксидного радикала. Такими процессами могут являться усиленная работа электрон-транспортных цепей митохондрий, или при повышении активности оксидазных ферментов [Crow, V15, p 1383].

Окислительные свойства молекулы пероксида водорода проявляются в условиях наличия ионов металлов переменной валентности, такого как железо, в

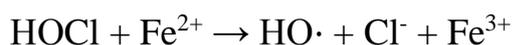
восстановленной форме. При таком взаимодействии происходит образование гидроксильного радикала, который обладает высокой химической активностью. Кроме того, накопление этого радикала способно влиять на значения водородного показателя клетки, что может приводить к нарушению работы ферментов из-за нарушений их нативной структуры [Осипов, Азизова, Владимиров, с. 180-208].



Пероксид водорода является важной молекулой в клетках, эта молекула принимается клеткой как молекула воды в случае отсутствия каталазы и ионов металлов с переменной. Биологическая активность перекиси водорода очень сильно зависит от концентрации ее в клетках. При концентрации в микромолярных значениях почти не проявляет активность, в то время как при миллимолярных концентрациях пероксид водорода начинает приобретать цитотоксические свойства и способна вызывать запрограммированную гибель клеток – апоптоз.

В сублетальных концентрациях пероксид водорода существенно изменяет статус клеток, что проявляется в ингибировании транспорта анионов через мембрану, увеличении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , активации фосфолипаз и фосфоинозитидного обмена, повреждает Cu,Zn-СОД, тем самым снижая антиоксидантную защиту клеток [Хависон, с. 10]. Клетки млекопитающих достаточно устойчивы к воздействию пероксида водорода, благодаря наличию глутатион-пероксидазной и каталазной ферментативных систем.

Гидроксильный радикал (HO^\cdot) – продукт восстановления пероксида водорода с металлами переменной валентности (восстановленная форма железа) в ходе реакции Фентона. Другим путем образования гидроксильного радикала в клетках является реакция разложения гипохлорита также в присутствии восстановленного иона железа [Менщикова, с. 553; Якутова, Дремина, Евгина, с. 275].



Установлено, что образование гидроксильного радикала возможно при разложении гипохлорита также и железо-независимым путем:



Обладая наиболее высоким в живой природе окислительным-потенциалом ($E_0=+2.7\text{В}$), что обуславливает высокую агрессивность гидроксид-иона, который оказывает действие практически на любую биологическую молекулу [Щерина, Крощикина, с. 6-12]. Но наибольший ущерб клетке наносят его реакции с ДНК, белками и полиненасыщенными жирными кислотами внутриклеточных и плазматических мембран, что определяет сильнейшее мутагенное и цитотоксическое действие гидроксильного радикала [Иллариошкин, с. 7].

1.2. АНТИПЕРЕКИСНАЯ ЗАЩИТА.

В организме животных и человека в норме всегда присутствует определенное количество перекисных соединений необходимых для работы различных сигнальных систем, однако для защиты от излишнего количества АФК и перекисных соединений в организме существует система антиоксидантов.

Работа антиоксидантных систем клеток направлена на уменьшение концентрации продуктов перекисного окисления, являющихся цитотоксическими, и снижения интенсивности перекисного окисления. Среди антиоксидантных ферментов выделяют три линии защиты:

- 1) СОД, пероксидаза,
- 2) глутатион-пероксидаза и каталаза,
- 3) селеновая глутатионтрансфераза [Зенков, с. 343].

Образование перекисных соединений, считается, что происходит двумя путями: ферментативным и неферментативным (аскорбатзависимый, активируемый металлами с переменной валентностью).

Наиболее известными неферментными антиоксидантами являются аскорбиновая кислота, токоферолы, полифенолы, танины. Их концентрация в

клетках различна, также эти вещества различаются по своим физико-химическим свойствам.

1.2.1. КАТАЛАЗА

Каталаза (КФ 1.11.1.6) - фермент антиоксидантной защиты, имеющий в своем составе четыре субъединицы, каждая из которых имеет сайт связывания с гемом и сайт связывания с НАДФН. Широко представлен во всех живых организмах, однако каталаза растительных и бактериальных организмов отличается от структуры каталазы млекопитающих. Пространственная модель представлена на рис.1.

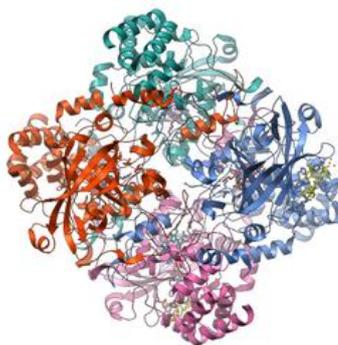


Рис.1. Пространственная модель каталазы печени млекопитающих.

Каждая из субъединиц представлена аминокислотной цепью около 500 аминокислот. Активный центр формируют аминокислоты: аспарагин в 148 положении и гистидин в 75. Эти аминокислоты обеспечивают ковалентные модификации несвязанного кислорода заякоренной молекулы перекиси водорода [Yonekura, p. 68].

Катализирует реакцию расщепления пероксида водорода до молекулярного кислорода и воды, однако имеются данные, что каталаза способна перерабатывать фенолы, муравьиную кислоту, ацетальдегид в присутствии пероксида водорода. Механизм протекания данных реакций до конца не изучен. Имеются данные, что протекает двухстадийно.

На первой стадии молекула перекиси водорода связывается с атомом железа гема, степень окисления железа, происходит сближение двух молекул перекиси водорода на различных субъединицах фермента и атомы кислорода,

несвязанные с железом субъединиц, реагируют с образованием молекулы кислорода и двух молекул воды [Boon, Downs, Marcey, p. 35].

Обладает высокой скоростью переработки перекиси до миллиона молекул в секунду. Наибольшая концентрация данного фермента наблюдается в эритроцитах, печени и почках млекопитающих, концентрация в головном мозге, соединительной ткани и половых железах мала. В клетках локализуется в пероксисомах. Реакция каталазы на действие стрессовых факторов может быть различной. Так, было установлено повышение активности КАТ в условиях дефицита магния.

1.2.2. ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗА

Глутатион-S-трансферазы (GST), ранее известные как лигандины, включали семейство метаболических изоферментов, наиболее известных своей способностью катализировать конъюгацию восстановленной формы глутатиона (GSH) к ксенобиотическим субстратам с целью детоксикации (рис.2) [Кутлина, с. 72-77].

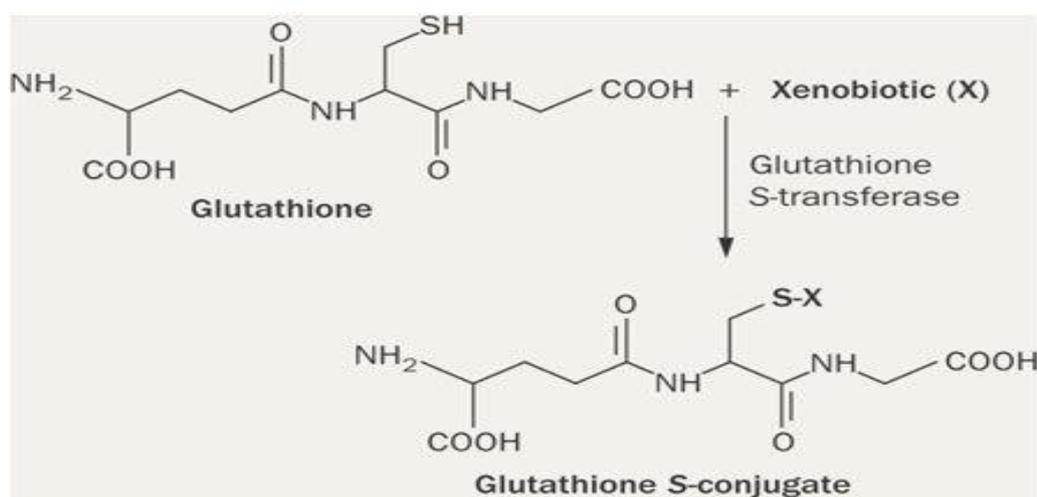


Рис.2. Схема реакции детоксикации ксенобиотика с участием GST.

Семейство GST состоит из трех надсемейств: цитозольного, митохондриального и микросомального [Matthew, p. 763]. Цитозольные GST-млекопитающие являются димерными, причем обе субъединицы относятся к одному классу GST, хотя и не обязательно идентичны. Мономеры составляют приблизительно 25 кДа.

Первичная роль GST заключается в детоксикации ксенобиотиков путем катализования нуклеофильной атаки глутатион (GSH) на электрофильные атомы углерода, серы или азота неполярных ксенобиотических субстратов, тем самым предотвращая их взаимодействие с критическими клеточными белками и нуклеиновыми кислотами.

Глутатион представляет собой трипептид линейной структуры. В его состав входят такие аминокислоты как L -глутамин, L -цистеин и глицин. Кроме участия глутатиона в реакциях с GST в качестве субстрата, но и определяет окислительно-восстановительный потенциал клеток.

Сайт связывания глутатиона или «G-сайт» расположен в тиоредоксиноподобном домене как цитозольного, так и митохондриального GST. Область, содержащая наибольшее количество изменчивости между сортированными классами, относится к спирали α_2 , где один из трех различных аминокислотных остатков взаимодействует с глициновым остатком глутатиона. Две подгруппы цитозольных GST были охарактеризованы на основе их взаимодействия с глутатионом: группа Y-GST, которая использует тирозиновый остаток для активации глутатиона и S / C-GST, который вместо этого использует остатки серина или цистеина. В обоих Y- и S / C-GST каталитический GSH-активирующий остаток происходит в «каталитической петле» после первой β -нити в тиоредоксиноподобном домене. Если присутствует каталитический тирозин или серин, гидроксильные группы этих остатков подают водородную связь с сульфидрилом GSH, способствуя образованию тиолятного аниона.

В частности, функция GST в этой роли двоякая: связывать как субстрат на гидрофобном H-сайте фермента, так и GSH на соседнем, гидрофильном G-сайте, которые вместе образуют активный участок фермента; и затем активировать тиольную группу GSH, позволяя нуклеофильную атаку на субстрат [Eaton, Bammler, p. 156]. Молекула глутатиона связывается в расщелине между N и C-терминальными доменами - каталитически важные остатки предлагаются для проживания в N-концевом домене.

GST ответственны за конъюгацию β 1-8,9-эпоксида, активного

промежуточного соединения, образованного из афлатоксина В₁, что является важным средством защиты от токсина у грызунов. Реакции детоксикации включают первые четыре стадии синтеза меркаптуровой кислоты с конъюгацией с GSH, служащим для того, чтобы сделать субстраты более растворимыми и позволять им удаляться из клетки транспортерами, такими как белок 1 с множественной лекарственной устойчивостью. После экспорта продукты конъюгации превращаются в меркаптуровые кислоты и выводятся из организма через мочу или желчь [Josephy, p. 3].

Активность GST зависит от постоянного питания GSH от синтетических ферментов гамма-глутамилцистеинсинтетазы и глутатионсинтетазы, а также действия конкретных транспортеров для удаления конъюгатов GSH из клетки [Смирнова, Шевцова, с. 1].

1.2.3. СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА

Супероксиддисмутазы (СОД) - универсальные ферменты организмов, катализирующие дисмутацию супероксида в кислород и перекись водорода. По своей природе являются продуктом метаболических процессов. СОД являются высокоактивными ферментами, контролирующими образование АФК и их токсичность. СОД являются первой линией защиты от свободных радикалов кислорода. Известно, что аэробы экспрессируют хотя бы один СОД. Эукариоты экспрессируют только СОД Cu/Zn (в цитоплазме и внеклеточно) и СОД Mn (в митохондриях) [Superoxide dismutases: ..., p. 1915-1928].

Медь- и цинксодержащая супероксиддисмутаза обнаружена у всех эукариот в цитозоле клетки, а также в маленьком количестве в лизосомах печени. Молекулярный вес фермента составляет порядка 33 кДа. В его состав входят: две идентичные субъединицы, содержащие ион меди и цинка, взаимодействующие между собой и влияющие на окружение друг друга; дисульфидный мостик внутри цепи; сульфгидрильная грулированная концевая аминокислотная группа [Волыхина, Шафрановская, с. 1-18]. СОД катализирует реакцию

диспропорционирования супероксидных анион-радикалов с образованием пероксида водорода и триплетного кислорода [Чевари, с.9-13].

СОД являются хорошо изученными белками, являющимися важнейшими ферментами, благодаря которым в клетках аэробов происходит обрыв цепей кислородзависимых свободнорадикальных реакций [Zelko, Mariani, Folz, pp. 337-349].

Ионы меди, входящие в состав молекулы, важны при катализе дисмутации. Ионы цинка помогают сохранить строго определенные конформации белка, необходимые для формирования реактивного медь-связывающего участка [Биоантиоксиданты, с. 61-65].

1.3. ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ.

Все АФК обладают высокой химической активностью, что обуславливает их цитотоксическое влияние на клетки и субклеточные структуры. Четыре наиболее вероятные мишени цитотоксичности АФК: индукция процессов ПОЛ в биологических мембранах, повреждение мембраносвязанных белков, инактивация ферментов и повреждение ДНК клеток.

Процессы перекисного окисления липидов в клетках минимальны и носят исключительно физиологический характер в условиях нормальной концентрации активных форм кислорода, но при увеличении концентрации АФК происходит интенсификация процессов ПОЛ [Зенков, Ланкин, Менщикова, с. 343; Galeotti, Masotti, Borello, p. 1041-1052]. Чрезмерная активация процессов ПОЛ может приводить к необратимым последствиям в клетках. К ним можно отнести нарушение нативной структуры белковых молекул, входящих в состав биологической мембраны из-за чего могут нарушаться процессы проницаемости мембраны для ионов, нарушение целостности мембраны.

Процессы перекисного окисления липидов состоят из трех основных этапов:

- 1) Зарождение цепи;

- 2) Развитие цепных реакций;
- 3) Обрыв цепи [Владимиров, с. 43-51].

Основной мишенью процессов перекисного окисления являются полиненасыщенные жирные кислоты, которые входят в состав фосфолипидов биологических мембран. На стадии инициирования или зарождения цепи происходит отрыв атома водорода в α -положении относительно двойной связи в молекуле жирной кислоты. Данный процесс способны индуцировать различные факторы такие как: ультрафиолетовое излучение, ионизирующее излучение, свободные радикалы кислорода и ряд прооксидантов. В результате отрыва одного из атомов водорода происходит перегруппировка заместителей у данного атома углерода, что влечет за собой изменение распределения электронной плотности, что обуславливает образование комплекса сопряженных двойных связей. В последующем именно к данному комплексу происходит присоединение кислорода [Хависон, с. 10-12; Dix, Aikens, P. 2-18].

Результатом данной реакции является образование липоперекисного радикала, который в дальнейшем способен запускать каскадный процесс образования радикалов. Эта способность липоперекисного радикала обусловлена наличием однозаряженного атома кислорода в составе молекулы, который и иницирует отрыв атома водорода у другой молекулы жирной кислоты. После чего эти процессы приобретают цепной характер [Зентов, Ланкин, Менщикова, с. 340].

Таким образом, перекисное окисление липидов представляет собой процесс, связанный с активацией кислорода, особенностью которого является то, что молекула O_2 присоединяется к свободному радикалу [Sürmen-Gür, Ozbek, Oztürk, p. 687-693].

Схема протекания реакций перекисного окисления липидов показана на рисунке 3. В результате получается новый липопероксильный радикал. В дальнейшем происходит взаимодействие этого радикала с другой молекулой ненасыщенной жирной кислоты, результатом этого является протекание ПОЛ.

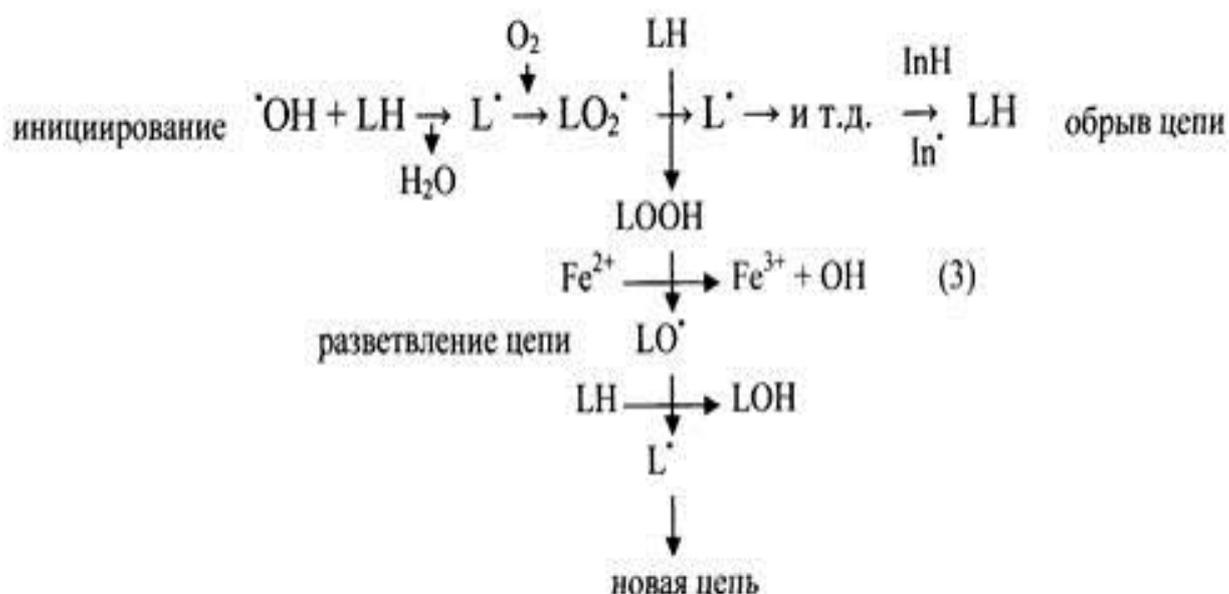


Рис.3. Реакции перекисного окисления липидов.

Образование перекисей липидов может осуществляться двумя путями: неферментативным и ферментативным. При первом пути происходит образование за счет реакции с металлами переменной валентности при участии аскорбиновой кислоты, которая участвует в процессе регенерации ионов металлов за счет обратного их восстановления. Данные процессы протекают во всех мембранных структурах. Протекание ферментативного образования липоперекисей локализовано в эндоплазматическом ретикулуме. Этот путь образования является НАДФН-зависимым [Менщикова, Ланкин, Зенков, с. 553].

Ферментативным путем происходит только генерация липоперекисей в активном центре фермента, образующиеся при этом эндоперекиси и гидроперекиси обладают высокой стереоспецифичностью и выполняют определенные биологические функции. В частности, это относится к циклооксигеназе и липооксигеназе.

Основным фактором протекания неферментативного цепного окисления в биомембранах является наличие металлов с переменной валентностью [Воейков, с. 27-38]. В биологических мембранах отчетливо прослеживаемое прооксидантное действие ионов восстановленного железа на ненасыщенные жирные кислоты обусловлено его участием в реакциях разложения продуктов гидроперекисей и образованием новых свободных радикалов, которые в свою

очередь инициируют новые цепи окисления.

В последние годы появилось много данных, свидетельствующих, что ионы железа активируют процессы перекисного окисления также за счет того, что они участвуют в образовании гидроксильного радикала [Kinnula, Soini, p. 27-34].

Обрывом цепи служат включение в одну из реакций антиоксидантов, таких как GST, GSH, витамин E. Если данные соединения не включились в процесс, то субстрат, а именно ненасыщенные жирные кислоты продолжит расходоваться [Klebanoff, p. 23-27]. Благодаря наличию в клетках антиоксидазных систем, процессы окисления регулируются и поддерживаются на определенном уровне, необходимом для функционирования клеточных структур и выполнения физиологических функций [Иллариошкин, с. 7-11].

Физиологическая роль перекисного окисления кроется в процессах самообновления мембранных структур, перестройки мембран и регулировании работы ионного транспорта. Кроме того, регуляция ферментативной активности мембрансвязанных ферментов [Galeotti, Masotti, Borello, p. 1041-1052].

Увеличение интенсификации перекисного окисления липидов может увеличиваться в арифметической прогрессии при воздействии на организм химических или физических факторов. Накопление активных форм кислорода происходит в организме, когда антиоксидантные системы дают сбой. Увеличение концентрации АФК в клетках может повлечь за собой развитие окислительного стресса, который проявляется на совершенно различных уровнях организации живого. Усиление окислительных процессов может приводить к патологиям и нарушениям в работе различных клеточных и не только систем [Boon, Downs, p. 35-38; Dix, Aikens, p. 2-18].

Повышение уровня ПОЛ наблюдается при многих заболеваниях, различных патологических состояниях и интоксикациях. При этом считают, что в случае болезни и интоксикации происходит возрастание ПОЛ, продукты которого и являются ответственными за повреждение клеток и тканей. Однако, как было установлено [Galeotti, Masotti, Borello, p. 1041-1052], поврежденные ткани подвержены перекисному окислению липидов в гораздо большей степени,

чем здоровые. Причина этого явления – инактивация некоторых биоантиоксидантов, утечка антиоксидантов из поврежденных клеток и выделение ионов металлов с переменной валентностью, особенно в восстановленной форме (железа и меди) из мест их накопления в клетках и из металлопротеинов, гидролизованных освободившимися из разрушенных липосом ферментами [Sürmen-Gür, Ozbek, Oztürk, p. 687-693].

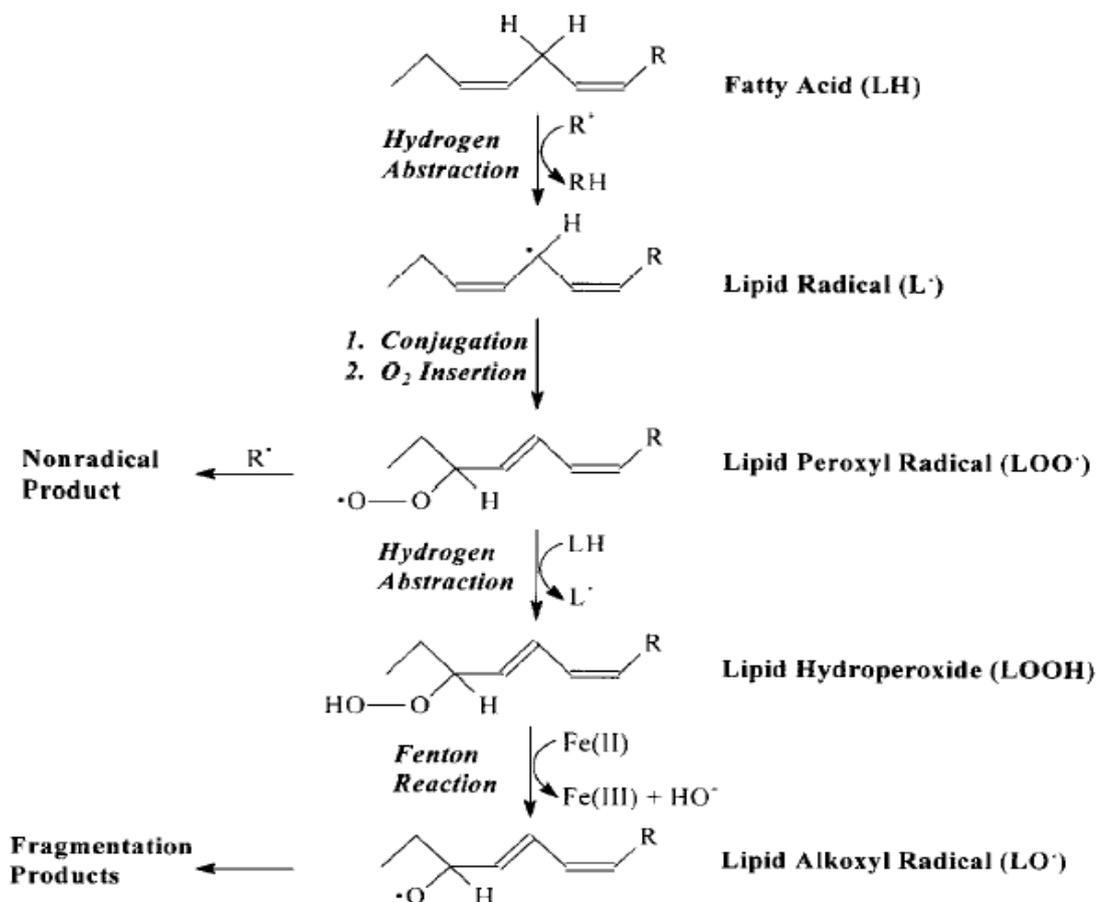


Рис.4. Радикальные и нерадикальные продукты ПОЛ

Состав продуктов ПОЛ достаточно неоднороден и сложен. Основную часть его составляют гидроперекиси, которые получают в результате цепных реакций. Гидроперекиси способны подвергаться нерадикальным окислительным процессам в результате, которых образуются первичные продукты перекисного окисления – диеновых конъюгатов, при дальнейших модификациях образуются конечные продукты перекисного окисления – малоновый диальдгид и основания шиффа [Зенков, с. 251].

Избыточное образование продуктов перекисации приводит к целому

появлению ряда вторичных продуктов. Эти продукты в основном являются альдегидами, способными усугубить окислительный ущерб [Зентов, Оанкин, Менщикова, с. 34]. Долговечность и высокая реакционная способность позволяют этим молекулам действовать внутри и снаружи клеток, взаимодействуя с биомолекулами, такими как нуклеиновые кислоты и белки, часто необратимо разрушая delicate механизмы, связанные с функциональностью клеток. Малоновый диальдегид (МДА) является основным и наиболее изученным продуктом перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот [Moore, Roberts, p. 659-661].

Реактивные виды кислорода деградируют полиненасыщенные липиды, образуя малоновый диальдегид. Это соединение представляет собой реакционноспособный альдегид и является одним из многих видов реакционноспособных электрофилов, которые вызывают токсическое напряжение в клетках и образуют ковалентные аддукты белка [Костюк, Потапович, с 105]. Производство этого альдегида используется в качестве биомаркера для измерения уровня окислительного стресса в организме.

Основным источником МДА в биологических образцах является перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот с двумя или более двойными связями, связанными с метиленом. Были предложены три гипотезы, описывающие *in vivo* образование МДА [Менщикова, Зенков, с. 105]. Прайор и Стэнли, основываясь на своем гипотетическом механизме на нелетучих свойствах предшественника МДА, описали, что предшественник как бициклический эндопероксид подобен тому, который образуется во время биосинтеза простагландина.

Предполагается, что МДА происходит от этих предшественников в стрессовых условиях. Этот механизм был подтвержден исследованием, проведенным Франкелем и Неффом, которые заметили, что окисленные липиды способны продуцировать МДА в качестве продукта разложения.

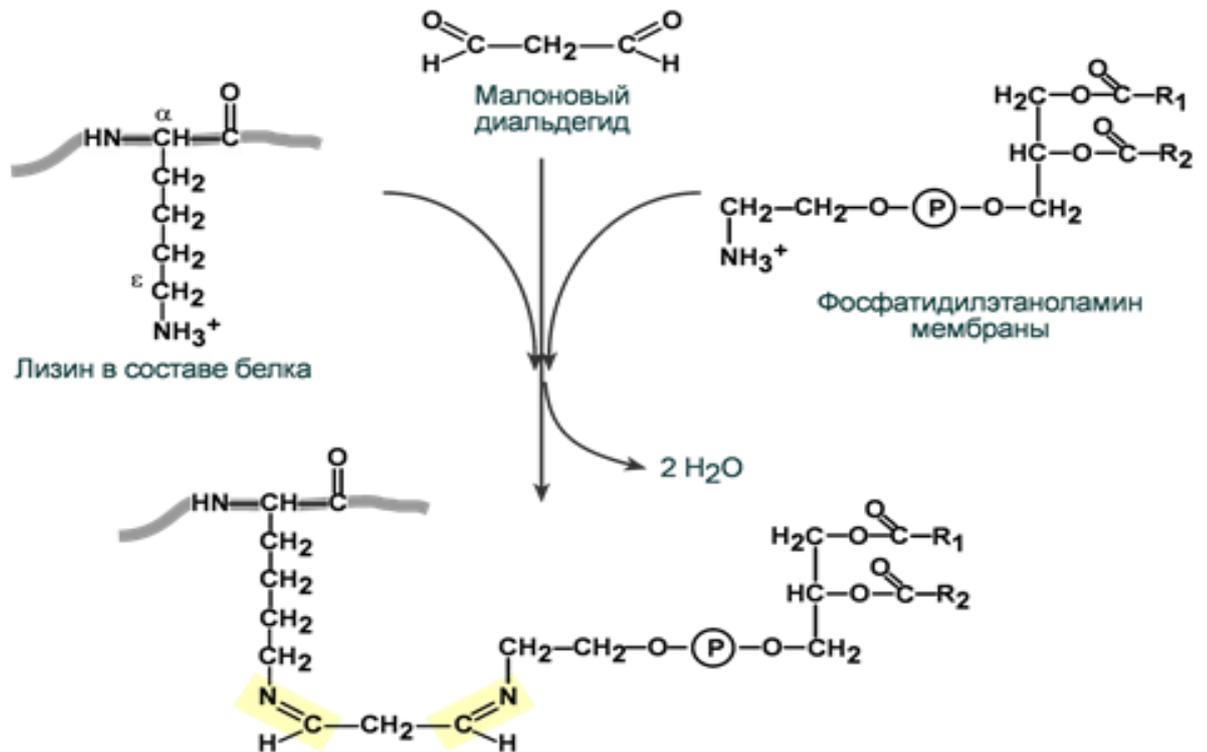


Рис.4. Роль малонового диальдегида в образовании сшивок между белками и фосфолипидами.

МДА в клетках способен создавать сшивки между молекулами жирных кислот, белков, что может приводить к изменению активности ферментов, нарушению протекания ферментативных процессов. На рисунке 4 представлена роль МДА в образовании сшивок между молекулами с образованием шиффовых оснований. Из-за наличия таких сшивок в молекулах или между ними активность сократительных белков падает, а функции канальных белков нарушаются, что ведет к увеличению проницаемости мембраны [Панов, 2018].

1.6. 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].

Ацетилхолин является передатчиком нервного импульса с парасимпатических постганглионарных нервов на иннервируемые клетки. В то время как с симпатических постганглионарных волокон передатчиком нервного импульса – нейромедиатором является норадреналин. Ответом на нервный импульс, синтезированный нейромедиатор проходит через синаптическую щель, достигая своих мишеней – рецепторов, которые запускают каскад биохимических реакций. Посредством этих реакций реализуется ответ на нервный импульс, выраженный в возбуждении и торможении. Кроме того, очень важную роль играет синтез нейромедиаторов, их способность накапливаться или вовремя инактивироваться соответствующими ферментными системами.

Общий адаптационный синдром организма к действию повреждающих факторов обеспечивается усилением работы таких желез внутренней секреции как гипофиз и кора надпочечников. При действии стресс-фактора на организм идет повреждение тканей и выделение «метаболита», который в свою очередь активизирует выброс гормонов, воздействия на гипофиз. Так усиливается выброс гормонов передней доли гипофиза таких как - соматотропный гормон (СТГ) и адренотропный гормон (АКТГ). Усиление секреции минералокортикоидов и глюкокортикоидов происходит посредством влияния АКТГ на кору надпочечников. Нервная и гуморальная ответная реакция на стрессоры всегда взаимосвязана. Именно этим и объясняется, по мнению Г.Селье, повышение устойчивости к действию различных стрессоров.

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 [Геворкян, Геворкян, с. 9-18].

Обычно проходит развитие только первых двух стадий стресс-реакции это - стадия тревоги и стадия резистентности. Однако, если действия стресс-фактора будет достаточно сильным и продолжительным, можно будет рассуждать о переходе к третьей стадии – истощение. Если же действие стрессора несильно – третья стадия не наступает.

3. Стадия истощения начинается при угнетении всех систем организма, а именно при угнетении адаптивной деятельности надпочечников. Все симптомы резко усиливаются [Schoner, p. 2440-2448].

Реакция тревоги характеризуется тем, что в организме появляются изменения характерные для первоначального действия стрессора, уровень резистентности снижается. Если воздействие на организм носит очень сильный характер, то резистентность может упасть до нуля, что приводит к гибели организма. Деятельность половых желез и щитовидной угнетаются из-за действия АКТГ на кору надпочечников и повышение секреции глюкокортикоидов и минералокортикоидов.

Во второй стадии - стадии резистентности - организм начинает адаптироваться к продолжающемуся воздействию стрессора. Характер изменений в тимико-лимфатической и эндокринной системах очень близок к таковому в стадии тревоги. Отличие от первой стадии состоит в том, что секреция глюкокортикоидов в стадии истощения постепенно снижается. Во время этой стадии организм также может погибнуть.

Фактически в остром стрессе существует лишь одна стадия – тревоги, если стрессор однократен и не настолько силён, чтобы приводить к стадии истощения. Стадия резистентности после реакции тревоги относится не к стрессу, а к другим реакциям на раздражители либо слабой, либо средней силы (активации, тренировки), в зависимости от степени запредельного торможения. Стадия истощения относится к хроническому или очень тяжёлому острому стрессу [Gutteridge, p. 1819-1828].

Любые сильные воздействия окружающей среды вызывают стандартную стресс-реакцию. При кратковременном действии стрессов умеренной интенсивности происходит усиление функционирования органов и мобилизация организма [Демьяненко Е.В. с. 36]. Активации стресс-систем и реализации повреждающих эффектов препятствуют стресс-лимитирующие системы. Одним из возможных компонентов быстрой реакции на стресс является активация процессов ПОЛ. Известно, что в нормальных условиях жизнедеятельности клетки постоянно присутствует определенный уровень перекисного окисления липидов, индуцированный образованием активных форм кислорода [Курганова Л.Н. с. 71; Семёнова, Марьяновская, с. 72-75].

Перекисное окисление липидов в клетке поддерживается на постоянном уровне благодаря многоуровневой антиоксидантной системе защиты. Таким образом, сбалансированность между обеими частями этой системы – перекисным окислением с одной стороны и антиоксидантной активностью с другой является необходимым условием для поддержания нормальной жизнедеятельности клетки [Демьяненко с. 36]. Учитывая необходимость сохранения прооксидантно-антиоксидантного равновесия в стационарном режиме, можно предположить, что его смещение является одним из первых неспецифических звеньев в развитии стресс-реакции и может служить, согласно Барабой [Барабой, с. 923-931], тем биологически важным изменением внутренней среды клетки, которое запускает другие механизмы защиты. Продукты ПОЛ могут являться как индукторами, так и первичными медиаторами стресса как особого состояния клетки, который может привести к

повышению её резистентности [Демьяненко Е.В. с. 36].

Вместе с тем, конечный физиологический эффект обеспечивается также процессами синтеза, накопления, высвобождения и инактивации медиатора. Синтез катехоламинов происходит в адренергических нейронах и хромафинных клетках. Из аминокислоты фенилаланина последовательно образуются тирозин, ДОФА (3,4-диоксифенилаланин), дофамин, норадреналин и адреналин [Шибеева диссертация].

Непосредственным продуктом превращения фенилаланина является тирозин. Суть реакции заключается во введении гидроксильной группы в бензольное кольцо. В реакции гидроксилирования фенилаланина участвуют никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) в восстановленной форме, молекула кислорода, а также в качестве кофактора тетрагидроптеридин.

Вторым этапом биосинтеза катехоламинов является гидроксилирование тирозина с образованием ДОФА. Эта реакция, катализируемая тирозингидроксилазой, является наиболее медленным процессом биосинтеза и лимитирует скорость образования катехоламинов.

Под действием дофа-декарбоксилазы происходит превращение диоксифенилаланина в дофамин. В качестве кофактора требуется пиридоксальфосфат.

Образование норадреналина из дофамина катализирует дофамин- β -гидроксилаза. Для активирования этого процесса необходимо наличие ионов тяжелых металлов, аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и аскорбиновой кислоты.

Последним этапом биосинтеза катехоламинов является превращение норадреналина в адреналин путем метилирования по азоту под действием фенилэтанол-*N*-метилтрансферазы. Этот этап осуществляется в надпочечниках; в адренергических нейронах синтез заканчивается на стадии норадреналина, так как здесь нет метилтрансферазы [Gutteridge, p. 1819-1828; Маслова, с. 1320-1328].

1.7. АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА И АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Ацетилхолинэстераза (АХЭ АСhЕ, ЕС 3.1.1.7) – фермент, катализирующий гидролиз ацетилхолина - играющий ведущую роль в механизме трансдукции нервного импульса в холинергических синапсах животных, представляет собой физиологический нейротрансмиттер нервной системы, и он был идентифицирован как ключевой элемент гомеостатического контроля врожденного иммунного ответа [Антиферментное действие и детоксикация... с. 108]. Ингибирование данного фермента необратимо и блокирует проведение нервного импульса. Вполне возможным считается участие холинергических систем в развитии стресс-реакций. АХЭ присутствует на высоких уровнях в мозге и нервах и на поверхностях эритроцитов. Показано также, что эндогенный ацетилхолин, который образуется после обработки животных антихолинэстеразным препаратом, способен стимулировать высвобождение из надпочечников кортикостероидов и других гормонов [Кривой, Кулешов, Матюшкин, с. 186].

Ацетилхолинэстераза (АСhЕ, ЕС 3.1.1.7) отличается высокой скоростью гидролиза ацетилхолина: за 1 минуту 295 молекул гидролизуемого АХ приходится на один активный центр. Высокая скорость гидролиза объясняется высокой степенью аффинности АХ и АХЭ и образованием прочносвязанного комплекса фермент- субстрат. Ацетилхолин не единственный возможный субстрат. АХЭ успешно гидролизует разнообразные эфиры карбоновых кислот, включая многие сложные эфиры жирных кислот (этилацетат, триацетин и др.) и ароматические сложные эфиры (например, фенилацетат), способен гидролизовать эфиры вторичных спиртов, при этом некоторые из этих субстратов гидролизуются примерно с такой же скоростью, как и АХ [Клайн, с. 105].

Концентрация стероидных соединений, обладающих дигиталис-подобной иммунореактивностью, согласно ряду исследований, может возрастать в тканях

животных в стрессовых условиях. Несмотря на ограниченность холинергического представительства в нервной системе компоненты системы ацетилхолина включаются в реакцию экстренной адаптации с начала действия стрессовых факторов и участвуют в формировании неспецифического и специфического компонентов.

Различают два основных типа холинорецепторов: Н-холинорецепторы (никотиновые) и М-холинорецепторы (мускариновые). Активация Н-холинорецепторов вызывает классический ионотропный эффект - быстрое и продолжительное изменение проницаемости мембраны для ионов натрия, что приводит к возбуждению клетки. Активация М-холинорецепторов, имеет метаботропный характер и через стимуляцию циклаз приводит к усилению продукции циклических нуклеотидов с последующими метаболическими изменениями в постсинаптической клетке системы вторичных мессенджеров. Эта активность значительно медленнее и вызывает небольшие изменения проницаемости и потенциала постсинаптической мембраны [Хайдарлиу, с. 55].

Ингибиторы АХЭ могут взаимодействовать либо с активным центром, либо с периферическими связывающими участками фермента. Такие ингибиторы как эзерин и прозерин (рис.6), инактивируют активный центр обратимо путем карбамоилирования гидроксильной группы серина. Образующиеся соединения представляют собой замещенные эфиры карбаминовой кислоты, реакция реактивации фермента протекает медленно. Эти антихолинэстеразные препараты используют для временного ингибирования эстеразы с целью продления или усиления действия ацетилхолина [Орехович, с. 251].

Физостигмин — парасимпатомиметический алкалоид, ингибитор холинэстеразы обратимого действия. Является главным алкалоидом калабарских бобов — семян западноафриканского растения *Physostigma venenosum* — физостигмы ядовитой. Является производным индола и содержит уретановую группу. Эзерин представляет собой кристаллическое бесцветное вещество, хорошо растворимое в спирте и малорастворимое в воде и эфире, теряет свою

активность при воздействии солнечного света.

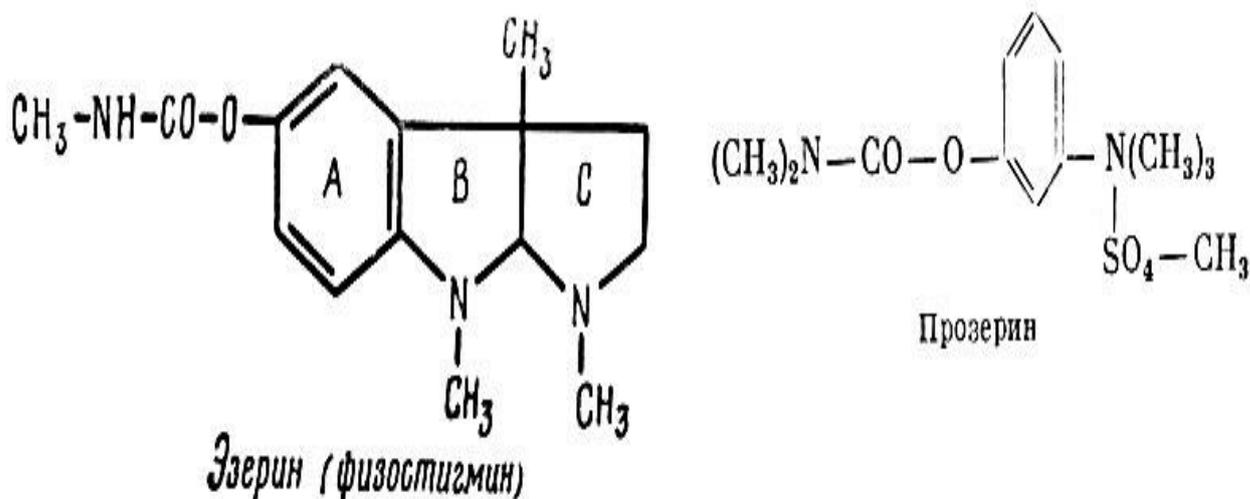


Рис.6. Структурные формулы обратимых ингибиторов ацетилхолинэстеразы.

Является холиномиметиком непрямого действия, вызывает обратимую блокаду ацетилхолинэстеразы, повышает концентрацию ацетилхолина, усиливает холинергическую передачу.

По сравнению с прозеринном обладает менее выраженным избирательным действием на Н-холинореактивные системы скелетных мышц. На другие холинореактивные системы прозерин действует слабее. Структуру эзерина и прозерина объединяет присутствие аммонийной и уретановой групп - первая нужна для правильной ориентации при взаимодействии с ацетилхолин-связывающим участком фермента, а вторая используется для присоединения к белку.

Эзерин связывается с холинэстеразой и лишает фермент способности гидролизовать ацетилхолин, выделяющийся в холинергических синапсах. Эта реакция приводит к накоплению ацетилхолина и возбуждению органов, снабжаемых холинергической иннервацией. Поэтому вызываемые эзеринном или другими антихолинэстеразными веществами эффекты во многом сходны с действием прямых холиномиметиков. При подкожном введении, приеме внутрь и нанесении на слизистые оболочки эзерин всасывается в кровь. Он сокращает ритм сердечных сокращений, суживает зрачок, усиливает перистальтику

кишечника, моторику желудка и секрецию пищеварительных желез, легко проникает из крови в мозг [Машковский, с. 150].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Исследование проводилось на базе лабораторий кафедры анатомии и физиологии человека и животных Тюменского государственного университета в 2017-2018 и 2019-2020 учебных годах.

2.1. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Объектом исследования служили крысы линии Wistar, в возрасте 8 недель. Содержались животные в виварии на полноценной диете.

В ходе работы все животные были разделены на четыре группы: 1-я группа контрольная; 2 – группа была подвергнута действию стресса с физической нагрузкой (40 минутное плавание в воде при температуре 28 С, с грузом на хвосте 3,5% от массы тела), животные 3-ей группы также были подвергнуты действию стресса после предварительной обработки антихолинэстеразным препаратом эзеринум в концентрации 0,15 мг/кг массы тела; 4 – группа также были подвергнуты действию стресса после предварительной обработки антихолинэстеразным препаратом прозеринум в концентрации 0,008 мг/кг массы тела.

2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ.

Конъюгирующую активность GST определяли с помощью субстрата 1-хлор-2,4-динитробензола (ХДНБ) по накоплению продуктов реакции конъюгации (в частности, GS-2,4-динитробензола), которое сопровождается изменением оптической плотности реакционной смеси.

Перед началом каждого опыта готовилась реакционная смесь, состоящая из:

- 1) 0,1М К-фосфатного буфера pH 6.5
- 2) 10 мМ раствора, восстановленного глутатиона в буфере (из расчета 1 мг глутатиона на 2 мл буфера)

3) 0,1 М ХДНБ в этаноле (из расчета 3 мг ХНДБ на 1 мл этанола).

Реактивы смешивались из расчета: 27 мл реактива 1 + 1 мл реактива 2 + 1 мл реактива 3 (на пять проб).

Гомогенат готовили из навески ткани коры головного мозга, печени и почек крыс. В расчете 5 мл трис-НСl буфера (рН 7,5) на 1 грамм ткани. Гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера-Элвехейма в течение пяти минут. После гомогенат центрифугировали на скорости 10000 обр/мин при температуре 4°C в течение 20 минут. По завершению центрифугирования супернатант отбирался в пробирки в объеме 100 мкл каждой анализируемой пробы, остальное количество надосадочной жидкости замораживалось для последующего определения концентрации белка. В пробирку, содержащую фермент, приливалось 2,7 мл реакционной смеси.

Время инкубации составляло 20 минут при температуре 27°C (на водяной бане), затем останавливали реакцию добавлением 0,2 мл 1н НСl. Определение оптической плотности при 340 нм против холостой пробы, которая содержала дистиллированную воду вместо фермента.

Контрольная проба готовилась из расчета на каждый гомогенат без инкубации сразу после добавления супернатанта приливалась НСl.

Подсчитывается разность оптической плотности между пробой и контролем ΔE . Концентрация белка в пробах определялась по методу Лоури [Nabig, Rabst, Jacoby, p. 7130-7139].

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

2.3. 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.

2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДИЕНОВЫХ КОНЬЮГАТОВ.

Определение концентрации диеновых конъюгатов производили после экстракции смесью изопропанол-гептан по методу И.Д. Стальной.

Навеску коры головного мозга, хвостатого тела, печени, почек и мембран эритроцитов гомогенизировали в экстрагирующей смеси изопропанол-гептан в соотношении 1:1 в расчете на 1 грамм ткани 9 мл экстрагирующей смеси. Гомогенизировали пробу гомогенизатором Поттера-Элвехейма в течение 15 минут, после чего центрифугировали в плотно закрытых пробирках, чтобы избежать испарения летучих фракций, при скорости 7200 обр/мин. Надосадочную жидкость отбирали в конические пробирки.

К полученному супернатанту добавляли 1/5 объема дистиллированной

воды, после чего активно встряхивали пробирку, ждали некоторое время и повторяли встряхивание. После расслоения пробы на фракции изопропил-вода-гептан отбирали гептановую фракцию и разводили в соотношении 1:8 с этиловым спиртом. Измерение оптической плотности производили против контрольной пробы, представленной экстрагирующей смесью, при длине волны 232 нм [Стальная, с. 6-7].

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

2.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА.

Для определения концентрации малонового диальдегида готовились следующие реактивы:

- 1) 0,025 М трис-НСl буфер рН 7,4, содержащий 0,175 М хлорида калия
- 2) 17% раствор трихлоруксусной кислоты
- 3) 0,8% водный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты

Навеску ткани коры головного мозга, почек, печени крыс гомогенизировали в растворе трис-НСl буфере в гомогенизаторе Поттера-Элвехейма из расчета 3 мл на 1 грамм ткани. После чего центрифугировали при скорости 7200 обр/мин в течение 10 минут. После чего отбирали 0,5 мл супернатанта в пробирку, затем приливали 2 мл ТХУ для осаждения белка, и вновь центрифугировали при скорости 7200 обр/мин в течение 10 минут. После чего к 2 мл супернатанта прибавляли 2,5 мл ТБК. Инкубировали в течение 10 минут на кипящей водяной бани.

Определение оптической плотности производилось против контрольной пробы, содержащей только буферный раствор и ТБК [Стальная, Гаришвили, с.63-65].

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

Стьюдента.

2.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА МЕТОДОМ ЛОУРИ.

Для определения концентрации белка готовились 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 и 1 мл реактива Б.
4. Реактив Г: Коммерческий реактив Фолина Sigma[®] разведенный в 2 раза дистиллированной водой.

В коническую пробирку вносили 0,5 мл анализируемого образца. Приливали 2,5 мл реактива В, перемешивали и выдерживали в течение 10 минут при комнатной температуре. При постоянном перемешивании вносили в пробирку 0,1 мл реактива Г и оставляли на 30 минут при комнатной температуре. Определяли оптическую плотность пробы при длине волны 450 нм. Определение концентрации белка проводилось при помощи калибровочного графика, построенного при помощи стандартного белка.

ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В качестве маркера развития стресс-реакции, использовали определение концентрации аскорбиновой кислоты и ее фракций в надпочечниках животных. Известно, что аскорбиновая кислота играет в процессе синтеза катехоламинов важную роль, выступая в качестве кофактора фермента дофамин- β -гидроксилазы который обеспечивает преобразование дофамина в норадреналин. Таким образом, уровень аскорбиновой кислоты в надпочечниках животных может быть использован в качестве маркера стресс-реакции.

Результаты, полученные нами при исследовании концентрации аскорбиновой кислоты и ее метаболитов в надпочечниках контрольной и опытных групп животных, представлены на рисунке 7.

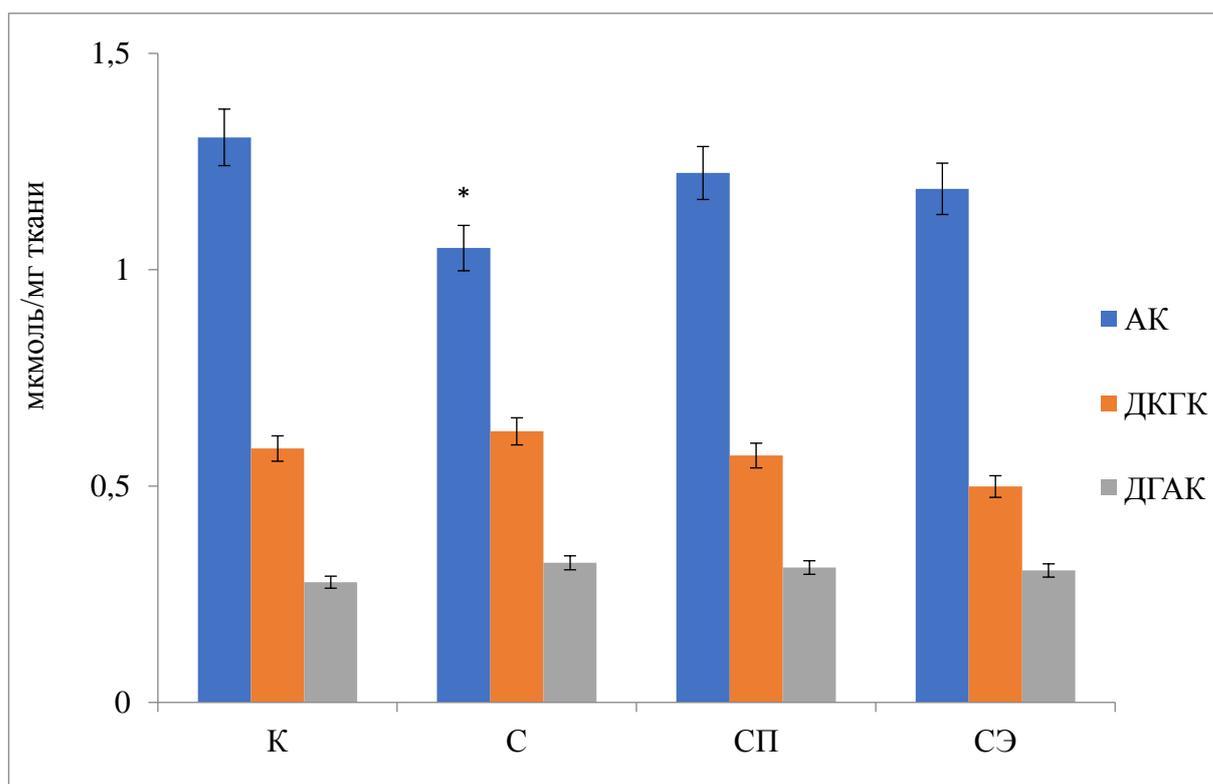


Рис.7. Концентрация аскорбиновой кислоты и ее фракций в мозговом слое надпочечников.

Примечание: АК – восстановленная форма аскорбиновой кислоты; ДАК – дегидроаскорбиновая кислота; ДКГК – дикетогулоновая кислота. * - различия с контролем статистически достоверны при $p < 0.05$.

Из рисунка видно, что концентрация аскорбиновой кислоты у группы

животных, подвергнутых стрессу, достоверно ниже, чем у группы контрольных животных, что свидетельствует о развитии в их организме стресс-реакции. Достоверных различий между контрольной группой и группой, обработанной антихолинэстеразным препаратом не выявлено.

Первичным проявлением окислительного стресса является увеличение концентрации диеновых конъюгатов в мембранах клеток. Данные продукты образуются на первом этапе ПОЛ и могут являться маркерами начальных этапов окислительного стресса. Данные по содержанию представлены на рис.8.

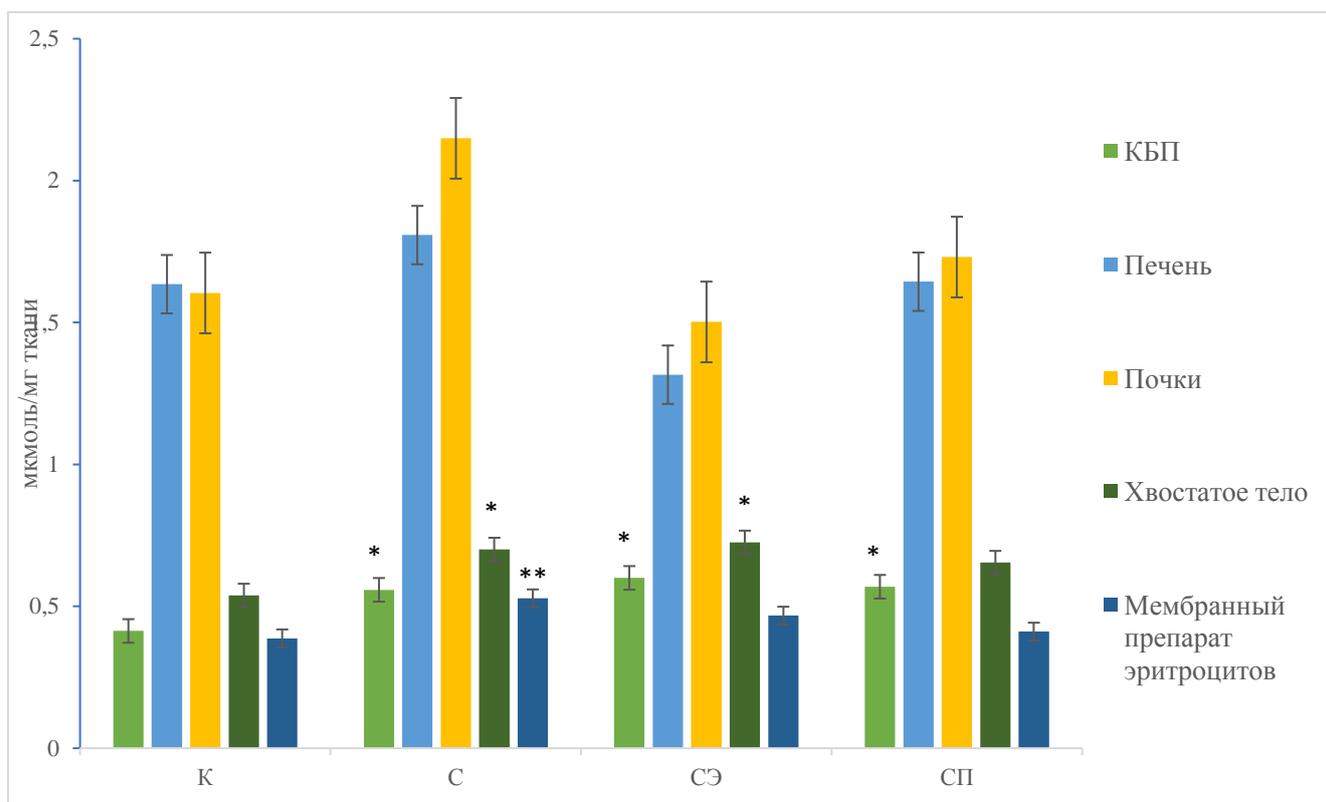


Рис.8. Содержание диеновых конъюгатов в различных препаратах тканей крыс.

примечание: * - различия достоверны при $p < 0,05$; ** - различия достоверны при $p < 0,01$.

(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).

Установлено увеличение концентрации диеновых конъюгатов в

препаратах коры больших полушарий головного мозга крыс всех опытных групп, а в препаратах хвостатого тела только у группы животных, подвергнутых стрессу и группы животных, подвергнутых стрессу и обработанных эзерином. Обнаружено увеличение концентрации ДК в препаратах мембран эритроцитов группы животных, подвергнутых стрессу.

Наиболее чувствительными тканями к изменению концентрации АФК являются нервная система и кровь. В данных тканях регистрируется повышение концентрации ДК при более меньших концентрациях АФК, в отличие от других тканей [Шаповаленко Н.С., с. 39-42]. Увеличение концентрации продуктов перекисного окисления липидов на стадии «тревоги», согласно литературным данным, обуславливается за счет интенсификации неферментативного ПОЛ в клетках. А также повышенным уровнем выхода АФК из клеток [Сурина-Марышева, с. 104-108; Журавлев, с. 19-30].

Вторичным продуктом перекисного окисления липидов является малоновый диальдегид, образующийся в результате взаимодействия активных форм кислорода с арахидоновой и другими полиненасыщенными жирными кислотами (рис.9).

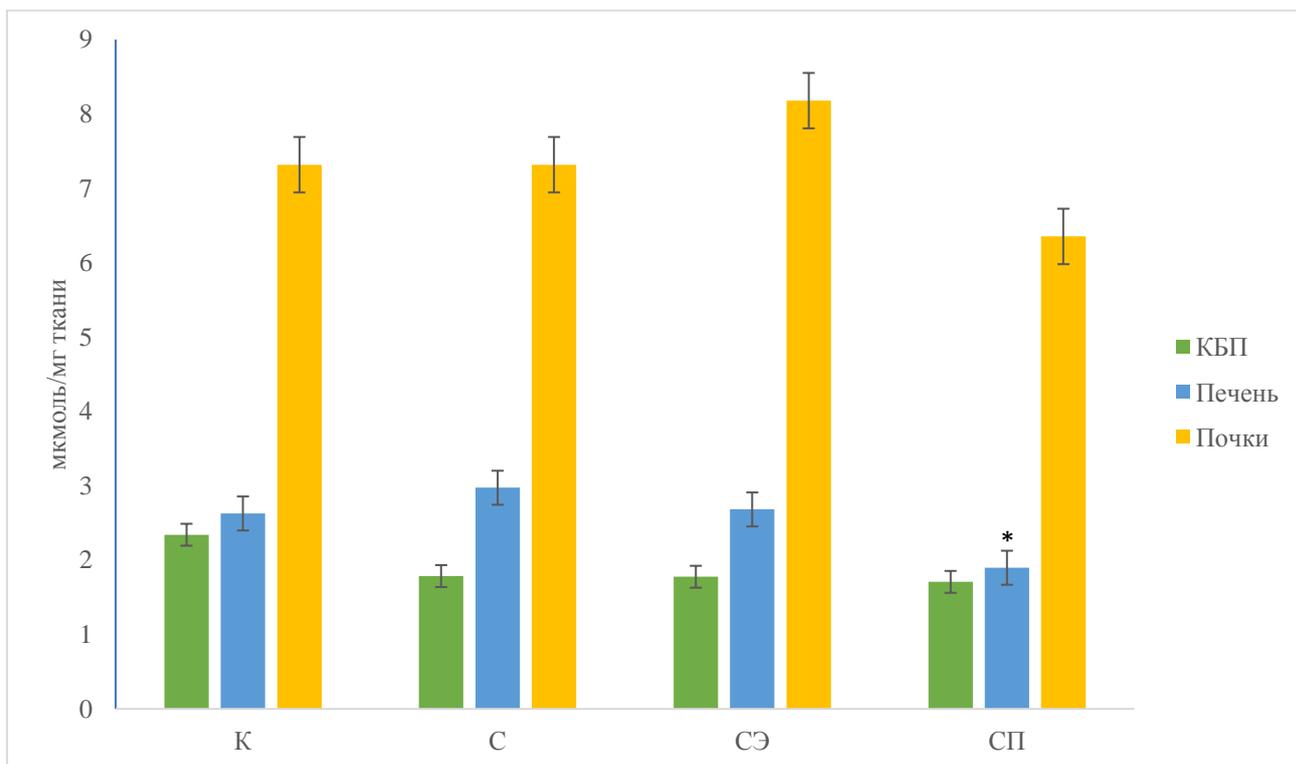


Рис.9. Содержание малонового диальдегида в различных препаратах

тканей крыс.

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

(к – контрольная группа; с – группа животных, подвергнутых стрессу; сэ – группа животных, подвергнутых стрессу и обработанных эзерином; сп – группа животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных прозеринном).

В результате исследований нами не выявлено увеличение концентрации малонового диальдегида, а показано уменьшение концентрации в препаратах печени у группы животных, подвергнутых действию стресса и обработанных прозеринном.

Результаты, полученные при определении активности СОД представлены на рис.10, видно, что в препаратах коры головного мозга у группы животных, подвергнутых стрессу и обработанных эзерином, активность растет.

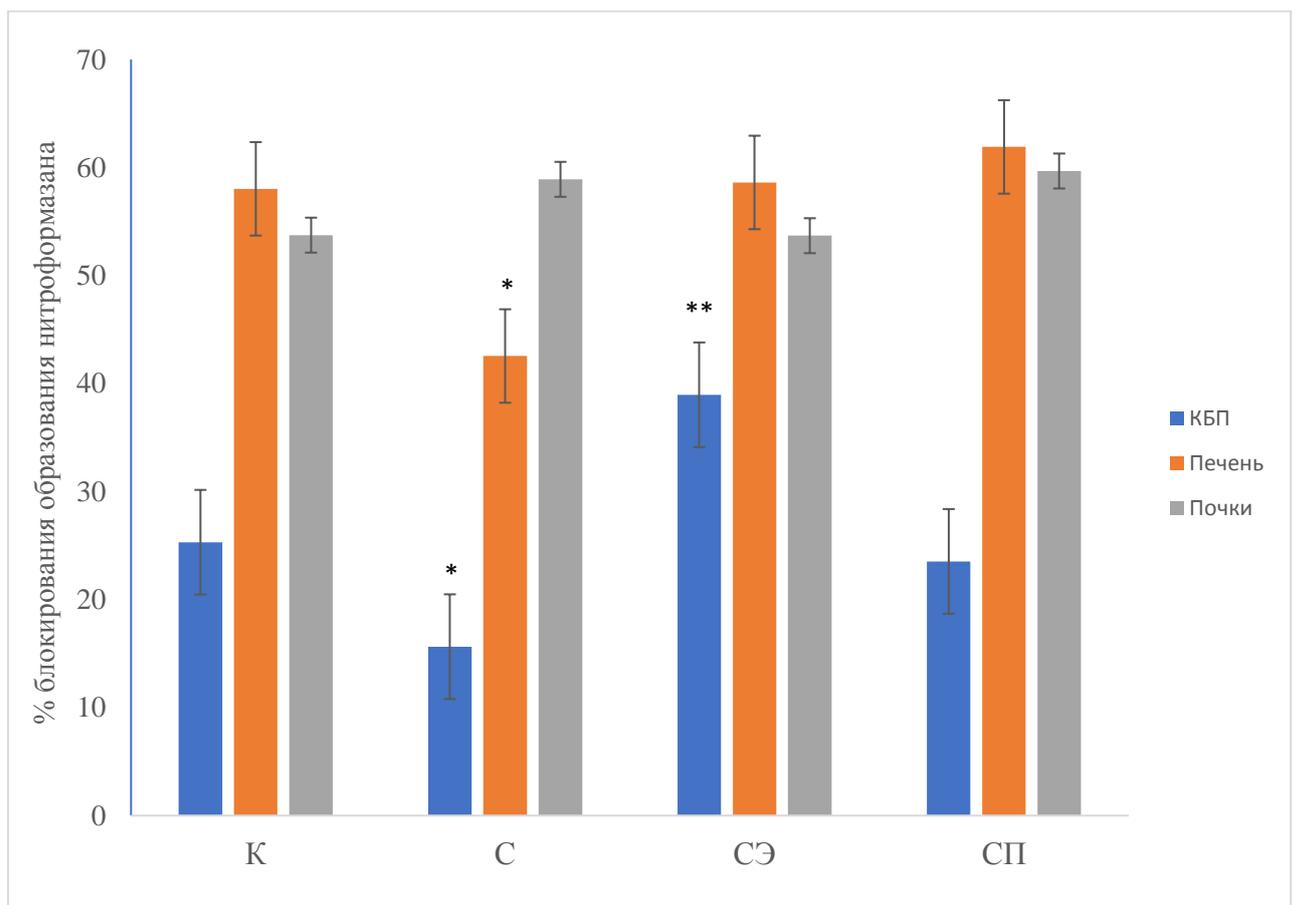


Рис.10. Активность супероксиддисмутазы в различных тканях крыс.

примечание: ** - различия достоверны при $p < 0,01$.

(к – контрольная группа; с – группа животных, подвергнутых стрессу; сэ – группа

животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных эзерином; сп – группа животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных прозеринном).

В связи с этим можно отметить, что это хорошо согласуется с данными, полученными при изучении активности другого фермента антиперикисной защиты - каталазы (табл.1.), функция которой заключается в разложении пероксида водорода, накопленного в клетке, в том числе и за счет работы СОД, до молекулярного кислорода и воды. Накопление ацетилхолина в КБП, обусловленное действием антихолинэстеразных препаратов по литературным данным, может индуцировать процессы аутоокисления биологических молекул, приводя к накоплению АФК [Дубинина, с. 561-581].

Таблица 1

Активность каталазы в препаратах различных тканей крыс (ммоль/г/мин)

	конт	стр	сэ	сп
Печень	440,93±17,47	448,61±17,76	419,61±32,97	445,19±10,04
Почки	448,57±27,19	409,91±6,78	378,57±14,76	455,77±21,34
КБП	0,147±0,024	0,185±0,011	0,216±0,0157*	0,140±0,011

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

(конт – контрольная группа; стр – группа животных, подвергнутых стрессу; сэ – группа животных, подвергнутых стрессу и обработанных эзерином; сп – группа животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных прозеринном).

Вторым этапом детоксикации, который реализуется в клетках является связывание ксенобиотиков с восстановленной формой глутатиона или другими субстратами конъюгации, данные процессы также могут активироваться в связи с усилением процессов перекисной модификации биологических молекул. Из представленных на рисунке 11 результатов исследования активности глутатион-S-трансферазы можно отметить увеличение активности фермента в коре больших полушарий головного мозга крыс всех опытных групп, так и

повышение активности GST в препаратах печени и почек группы животных, подвергнутых действию стресса и обработанных предварительно эзерином и увеличение активности фермента в препаратах печени у группы животных подвергнутых действию стресса и обработанных предварительно прозерином.

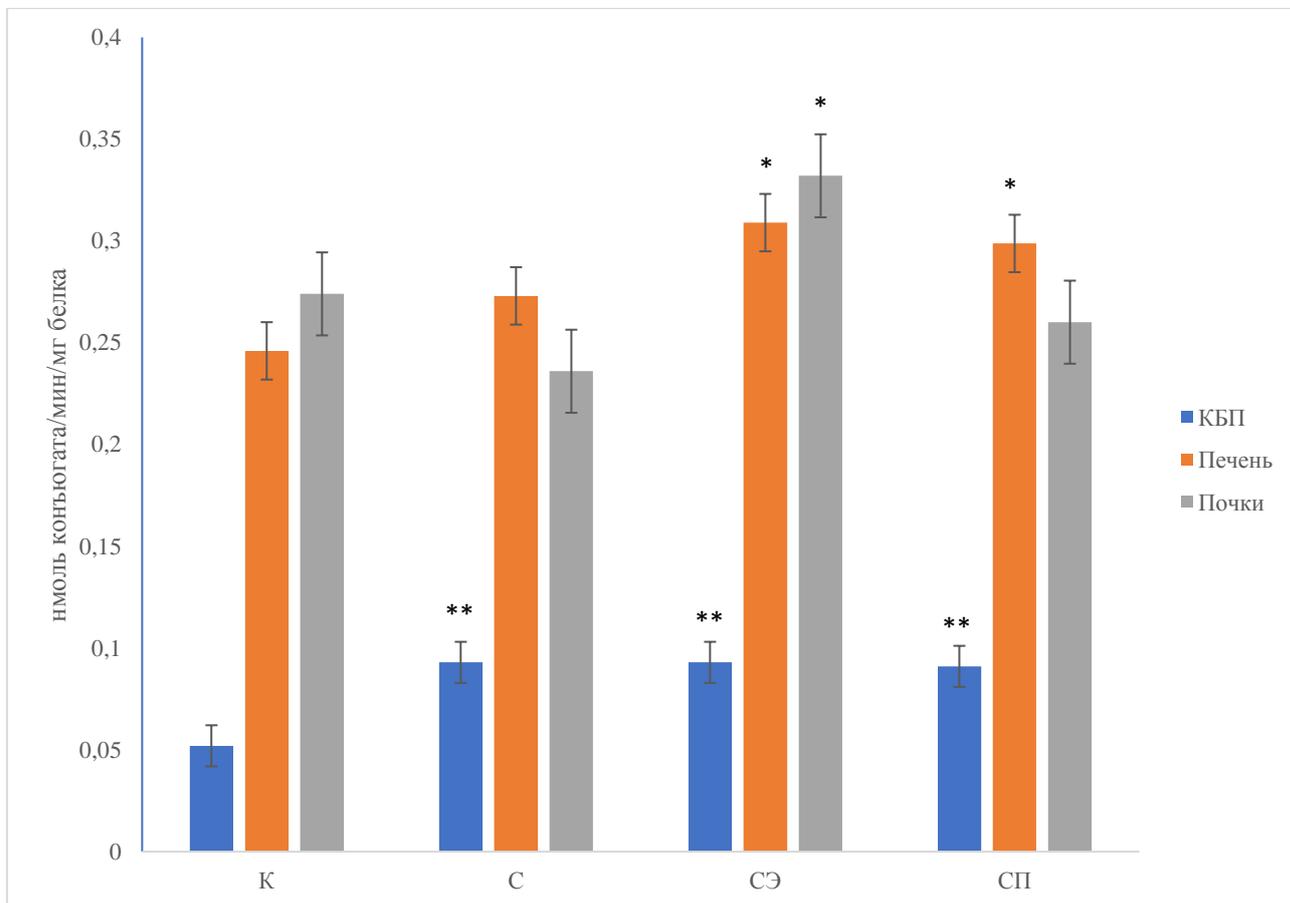


Рис.11. Активность глутатион-S-трансферазы в различных препаратах тканей крыс.

примечание: * - различия достоверны при $p < 0,05$; ** - различия достоверны при $p < 0,01$.

(к – контрольная группа; с – группа животных, подвергнутых стрессу; сэ – группа животных, подвергнутых стрессу и обработанных эзерином; сп – группа животных, подвергнутых стрессу и предварительно обработанных прозерином).

Повышение активности GST в коре больших полушарий может быть связано с тем, что эта ткань наиболее чувствительная к изменениям концентрации АФК и свободных радикалов. GST играет важную роль в трансформации ксенобиотиков, таких как эзерины [Шаповаленко, с. 39-42].

Проникновение эзерина в клетки КБП характеризуется высоким значением и может обуславливать повышение активности фермента в данной ткани [Дубинина, с. 561-581; Тихонов, с. 17-24].

Выводы:

1. Обнаружено увеличение концентрации первичных продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов в микросомально-митохондриальной фракции различных тканей головного мозга крыс у всех опытных групп, а в мембранных препаратах эритроцитов только в группе животных, подвергнутых стрессу.
2. Не выявлено увеличения концентрации малонового диальдегида в группах животных подвергнутых стрессу ни в одной из тканей, также в группах обработанных антихолинэстеразными препаратами, зафиксировано уменьшение концентрации малонового диальдегида в микросомально-митохондриальной фракции печени у группы животных, подвергнутых действию стресса и обработанных прозеринном относительно контрольной группы.
3. Исследование активности супероксиддисмутазы и каталазы выявило повышение в гомогенате коры больших полушарий головного мозга крыс, подвергнутых действию стресса и обработанных эзеринном относительно контрольной группы.
4. Отмечено наибольшее увеличение как метаболитов перекисного окисления биологических молекул, так и увеличение активности ферментов антирадикальной защиты в коре больших полушарий головного мозга крыс всех опытных групп.
5. 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. P. 35-38.
2. Cross A. R., Jones O. Aerobic and anaerobic functioning of superoxide-producing cytochrome b-559 reconstituted with phospholipids // *Biochem. biophys. acta.* 1991. Vol. 1057. P. 281–298.
3. Crow, J.P. Catalytic antioxidants to treat amyotrophic lateral sclerosis // *Expert Opin Investig Drugs.* 2006. Vol. 15. №11. P. 1383-1393.
4. Dix T.A. Mechanisms and biological significance of lipid peroxidation initiation / *Chem. Res. Toxicol.*, 2005. - Vol. 6. - P. 2-18.
5. Eaton D., Bammler T. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology // *Toxicol Sci.* 1999. №42. P. 156-164.
6. Electron crystallography of ultrathin 3D protein crystals: atomic model with charges. / Yonekura K, [et all] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2015. № 12. P. 3368-3373.
7. Galeotti T., Masotti L., Borello S. Oxy-radical metabolism and control of tumour growth // *Xenobiotika.* 2003. №21. P. 1041-1052.
8. Gutteridge J. M. Lipid peroxidation and antioxidation as biomarkers of tissues damage / *Clinikal Chemistry*, 2005. Vol. 41. №12. P. 1819-1828.
9. Habig W.H., Pabst M.J., Jacoby W.B. Glutathion-S-transpherase: the first step in mercapture acid formation / *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 249. P. 7130-7139.
10. Josephy P. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology / *Hum Genomics Proteomics.* 2010. №1. P. 3-14.
11. Kinnula V. L., Soini Y. Antioxidant redox signal // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 4. № 1. P. 27–34.
12. Klebanoff S. J. Myeloperoxidase: role in neutrophil – mediated toxicity // *Molecular Biologi and Infectious Diseases.*, 2006. Vol. 24. P. 23-27.

13. Matthew C. J. Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme // *Biochem. J.* 2005. №388. P. 763-771.
14. Melov S. Animal models of oxidative stress, aging and therapeutic antioxidant interventions / *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2003. Vol. 34. P. 1395-1400.
15. Moore K., Roberts L. Measurement of lipid peroxidation // *Free Radic Res.* – 1998. №6. P. 659-661.
16. Okado-Matsumoto A. Subcellular distribution of superoxide dismutases in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria // *J. Biol. Chem.*, 2003. Vol. 276. P. 38388-38393.
17. Schoner W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones / *Eur. J. Biochem*, 2002. № 269. P. 2440–2448.
18. Sürmen-Gür E. Ozbek R., Oztürk E. Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia / *Pediatr Hematol Oncol.* 2000. №8. P. 687-693.
19. Антиферментное действие и детоксикация фосфорорганических ингибиторов холинэстераз / Абдувахабов А.А., Михайлов С.С., Садыков А.С. [и др.] Ташкент: Фан, 1989. 184 с.
20. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / *Успехи соврем. Биологии*, 1991. Т. 111. № 6. С. 923-931.
21. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М: Медицина, 2007. 704 с.
22. Бондарь Т.Н., Ланкин В.З., Антоновский В.А. Восстановление органических гидроперекисей глутатионпероксидазой и глутатион-S-трансферазой: влияние структуры субстрата // *Докл. АН СССР.* 1989. №1.
23. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // *Вестн. РАМН*, 1998. № 7. С. 43-51.
24. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // *Вестник РАМН*, 1998. № 8. С. 43-51.
25. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биомембранах М.: Наука, 2003. – 380 с.
26. Воейков, В.Л. Благотворная роль активных форм кислорода / *Биохимия*, 2004. № 1. С. 27-38.

27. Воскресенский О.Н., Левицкий А.П. Перекиси липидов в живом организме / Вопр. мед. Химии, 2003. Т. 16. № 6. С. 563-583.
28. Геворкян В.С., Геворкян И.С. Современные исследования воздействия различных стресс-факторов на крыс и мышей // Альманах Пространство и Время. 2017. Т. 15. № 1. С. 11-31.
29. Демьяненко Е.В., Соловьева И.В. Изменения показателей перекисного окисления липидов и активности оксидантноантиоксидантной системы организма на фоне введения мезенхимальных стволовых клеток при остром иммобилизационном стрессе в условиях эксперимента // Современные тенденции развития науки и технологий. 2017. № 2-4. С. 36-42.
30. Джатдоева А.А., Проскурина Е.В., Нестерова А.М. Митохондрии как источники супероксидного анион-радикала в тромбоцитах // Биологические мембраны. 2017. №6. С. 116-123.
31. Дубинина Е.Е. Биологическая роль супероксидного анион-радикала и супероксиддисмутазы в тканях организма // Успехи современной биологии, 2004. Т. 108. №1. С. 3-17.
32. Дубинина Е.Е., Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса / Вопросы медицинской химии. 2001. Т-47. № 6. С. 561-581.
33. Журавлев А.И. Биоантиокислители в живом организме // Бюл. физ. и пат. дых, 2003. № 5. С. 19-30.
34. Зайцев В.Г., Закревский В.И. Методологические аспекты исследований свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма // Вестник Волгоградской медицинской академии. 1998. №4. С. 49-53.
35. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. М: Наука, 2004. 343 с.
36. Иллариошкин С.Н. Антиоксиданты и свободные радикалы: вечная проблема и новые пути ее решения / Формула здоровья. Нервы. 2011. № 2. С.7-11.
37. Клайн В. Успехи стереохимии: пер. с англ. М.: Госхимиздат, 1961. 744 с.

38. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Мн.: БГУ, 2004. 179 с.
39. Кривой И.И., Кулешов В.И., Матюшкин Д.П. Нервно-мышечный синапс и антихолинэстеразные вещества. СПб.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1987. 240 с.
40. Курганова Л.Н. Перекисное окисление липидов – одна из возможных компонент быстрой реакции на стресс // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2001. № 6. С. 76-78.
41. Маслова М.Н. Молекулярные механизмы стресса, М.: Физиологический журнал им И.М. Сеченова, 2005. Т.91. №11. С.1320-1328.
42. Машковский М.Д. Лекарственные средства // М.: Новая волна. 2014. 1216 с.
43. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Окислительный стресс (диагностика, терапия, профилактика) / Новосибирск: Наука, Сибир. отд-ние, 1993. 181 с.
44. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты /Н.К. Зентов, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. М: Наука. – 2001. – 340 с.
45. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З, Зенков Н.К. [и др.]. М: Слово, 2006. 553 с.
46. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии М.: Медицина, 1997. 391 с.
47. Осипов А.Н., Азизова О.А., Владимиров Ю.А. Активные формы кислорода и их роль в организме // Успехи соврем. биологии. 2003. №31. С. 180-208.
48. Осипов А.Н., Якутова Э.Ш., Владимиров Ю.А. Образование гидроксильных радикалов при взаимодействии гипохлорита с ионами железа / Биофизика. 2003. №3. С. 390-396.
49. Панов А.В. Активация изопространственного перекисного окисления липидов в митохондриях пергидроксильным радикалом HO_2 // Молекулярная биология. 2018. Т. 52. № 3. С. 347-359.
50. Процессы перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах при циррозе печени. / Коношенко С.В. [и др.] // Ученые записи Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского

Биология. 2017. Т. 3. № 3. С. 57-62

51. Свободнорадикальное окисление и старение / Хавинсон В.Х., Баринов В.А., Арутюнян А.В., Малинин В.В. // М.: ЦНМБ Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, 2016.

52. Смирнова Е.Ю. Использование глутатион-S-трансферазы как маркера окислительного стресса в токсикологических исследованиях // Молодёжь и наука: Сборник материалов VII Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных, посвященной 50-летию первого полета человека в космос. Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2011. С. 14-18.

53. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот. // Журнал аналитической химии. Т. 30. №4. С.6-7

54. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г., Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. // Современные методы в биохимии. 1997. С. 63-65

55. Сурина-Марышева Е.Ф., Интенсивность процессов перекисного окисления липидов при иммобилизационном стрессе // Человек. Спорт. Медицина. 2008. №4. С. 104-108.

56. Суханова Т. А. Патохимия клетки // Успехи соврем. биологии, 2004. Т. 40. С. 82-104.

57. Тиханов В.И. Изменение содержания продуктов перекисного (свободнорадикального) окисления липидов печени, вызываемого неостигмином, на фоне предварительного введения животным гексаметония и 3-часового охлаждения животных / Дальневосточный медицинский журнал. 2016. № 2. С. 17-24.

58. Хависон, В.Х. Свободнорадикальное окисление и старение // Вестник РАН. 2003. №4. С. 10-12.

59. Хайдарлиу С.Х. Функциональная биохимия адаптации, Кишинев: Штиинца, 1984. 270 с.

60. Чевари С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лабораторное дело. 1991. № 10. С. 9-13.
61. Чевари С., Чаба И., Секей П. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки, метод ее определения в биологических материалах // Лабораторное дело. 1985. № 11. С. 678-681.
62. Шаповаленко Н.С. Влияние холодового стресса на интенсивность перекисного окисления липидов и антиоксидантную систему тканей экспериментальных животных / Бюл. физ. и пат. дых.. 2011. №39. С. 39-42.
63. Шibaева Т.Н. Влияние стресса на функциональное состояние периферических отделов симпатoadренальной системы: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13. М., 1984.
64. Щерина А.В., Крошихина К.Э. Свободнорадикальная активность в патогенезе опухолей головного мозга // Наука молодых – Eruditio Juvenium. 2018. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/svobodnoradikalnaya-aktivnost-v-patogeneze-opuholey-golovnogo-mozga> (дата обращения: 18.04.2020).
65. Экспрессия гена GSTM при токсическом повреждении печени экспериментальных животных. / Кутлина Т.Г. [и др.] // Медицина труда и экология человека. 2018. № 1. С. 72-77.
66. Якутова Э.Ш., Дремина Е.С., Евгина С.А. Образование свободных радикалов при взаимодействии гипохлорита с ионами железа / Биофизика. 2004. №2. С. 275-279.