

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области
«ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ»

НА ПРАВАХ РУКОПИСИ

УДК 616-092 : 591.139 : 577.175.82 (043.3)

ЩЕРБАКОВ ДЕНИС ЛЕОНИДОВИЧ

**ВЛИЯНИЕ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ НА ПЕРЕКИСНОЕ
ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И АНТИОКИСЛИТЕЛЬНУЮ
АКТИВНОСТЬ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕСС-
ВОЗДЕЙСТВИИ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА**

Специальность 03.03.01 – физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Научные руководители:
Мещанинов В.Н., профессор,
доктор медицинских наук

Ястребов А.П., профессор,
доктор медицинских наук
заслуженный деятель науки РФ
член-корреспондент РАН

ЕКАТЕРИНБУРГ – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1 - ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 - Перекисное окисление липидов и антиокислительная активность в организме животных и человека в норме	11
1.2 - Перекисное окисление липидов и антиокислительная активность в организме животных и человека при экстремальном воздействии	14
1.3 - Возрастные особенности изменения процессов перекисного окисления липидов и антиокислительной активности в организме животных и человека.....	16
1.4 - Иммобилизация, как разновидность экстремального психоэмоционального стресс-воздействия у животных и человека ...	19
1.5 - Возрастные особенности стресс-реакции в организме животных и человека.....	21
1.6 - Участие медиаторов адренергической системы в реализации стресс- реакции при экстремальных воздействиях	22
1.7 - Участие медиаторов холинэргической системы в реализации стресс- реакции при экстремальных воздействиях	25
1.8 - Особенности влияния никотиновой кислоты на метаболизм L-триптофана в организме животных и человека	26
1.9 - Некоторые производные L-триптофана с антиокислительными и седативными свойствами	30
ГЛАВА 2 - МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1 - Общая характеристика лабораторных животных использованных в исследованиях.....	33
2.2 - Проводимые на животных воздействия.....	34
2.3 - Методика инкубирования миелокариоцитов с адреналином и ацетилхолином in vitro.....	36
2.4 - Получение периферической крови, миелокариоцитов и гомогенатов органов крыс.....	38
2.5 - Оценка состояния перекисного окисления липидов в органах и периферической крови у крыс.....	39

2.6 - Оценка состояния антиокислительной активности в органах и периферической крови у крыс.....	40
2.7 - Оценка липидного и липопротеидного состава крови и органов крыс	43
2.8 - Морфологическое исследование периферической крови и надпочечников крыс.....	44
2.9 - Некоторые вспомогательные лабораторные методы исследования...	44
2.10 - Методы статистической обработки результатов исследования.....	45
ГЛАВА 3 - ИЗМЕНЕНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ У КРЫС ЗРЕЛОГО И СТАРОГО ВОЗРАСТА ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕСС-ВОЗДЕЙСТВИИ.....	
3.1 - Состояние процессов перекисного окисления липидов и антиокислительной активности периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии.....	47
3.1.1 - Состояние процессов перекисного окисления липидов в периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии.....	48
3.1.2 - Состояние процессов антиокислительной активности в периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии	50
3.2 - Состояние процессов перекисного окисления липидов и антиокислительной активности в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии.....	55
3.2.1 - Состояние процессов перекисного окисления липидов в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии.....	55
3.2.2 - Состояние процессов перекисного окисления липидов в межклеточной среде костного мозга у зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии.....	58
3.2.3 - Участие процессов перекисного окисления липидов в изменении количества ретикулоцитов периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии.....	61

3.2.4 - Участие фосфолипазы A2 в изменении интенсивности процессов перекисного окисления липидов миелокариоцитов костного мозга зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии	66
3.2.5 - Состояние антиокислительной активности в миелокариocyтах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии	68
ГЛАВА 4 - ВЛИЯНИЕ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ ВЕГЕТАТИВНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И АНТИОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ У ЗРЕЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕСС–ВОЗДЕЙСТВИИ.....	73
4.1 - Изучение действия адреналина и ацетилхолина на изменения перекисного окисления липидов и антиокислительную активность в периферической крови и костном мозге у зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии.....	73
4.1.1 - Влияние ацетилхолина и адреналина на изменение интенсивности процессов перекисного окисления липидов и антиокислительную активность в периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии.....	74
4.1.2 - Влияние ацетилхолина и адреналина на изменения интенсивности процессов перекисного окисления липидов и антиокислительную активность миелокариocyтах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии.....	78
4.2 - Изучение действия адреналина и ацетилхолина на процессы перекисного окисления липидов в миелокариocyтах зрелых и старых крыс <i>in vitro</i>	85
4.2.1 - Изменение перекисного окисления липидов в миелокариocyтах зрелых и старых крыс при инкубации с адреналином <i>in vitro</i>	85
4.2.2 - Изменение перекисного окисления липидов в миелокариocyтах зрелых и старых крыс при инкубации с ацетилхолином <i>in vitro</i>	90

ГЛАВА 5 - ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАНИЯ L-ТРИПТОФАНА И НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ, АНТИОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ И ЛИПИДНО- ЛИПОПРОТЕИДНЫЙ СОСТАВ У ЗРЕЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕСС-ВОЗДЕЙСТВИИ.....	98
5.1 - Влияние совместного введения L-триптофана и никотиновой кислоты на процессы перекисного окисления липидов и антиокислительную активность в периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии.....	98
5.2 - Влияние совместного введения L-триптофана и никотиновой кислоты на процессы перекисного окисления липидов и антиокислительную активность в миелокариocyтах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии.....	102
5.3 - Влияние совместного введения L-триптофана и никотиновой кислоты на процессы перекисного окисления липидов и антиокислительной активности в головном мозге зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии.....	106
5.4 - Влияние совместного введения L-триптофана и никотиновой кислоты на процессы перекисного окисления липидов и антиокислительной активности в печени зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии.....	109
5.5 - Влияние сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты на изменение липидного и липопротеидного состава крови у зрелых и старых крыс в норме и при иммобилизационном стресс-воздействии	112
5.6 - Влияние сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты на психо- эмоциональное состояние зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии.....	119
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	122
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	135
ВЫВОДЫ	136
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	137
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	138

ВВЕДЕНИЕ

Изменение интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиокислительной активности (АОА) имеет решающее значение в реализации механизмов старения организма [180, 185]. На процессы ПОЛ влияют многие факторы, один из них - это стресс-реакция, вызванная экстремальным воздействием [31, 39, 101, 119, 135]. По данным ряда авторов, с развитием стресс-реакции в организме животных и человека происходит активация ПОЛ [5, 25, 36, 37, 95, 108, 113, 123, 161].

Стресс-воздействие приводит к развитию в организме общего адаптационного синдрома, ведущую роль в котором играет вегетативная нервная система [3, 19, 120, 183]. Известно, что вегетативная нервная система влияет на ряд функций организма [3, 89], но о влиянии на систему перекисного окисления липидов и антиокислительной активности (ПОЛ/АОА) при стрессе данных не достаточно. Нейромедиаторы симпатического отдела вегетативной нервной системы (адреналин, норадреналин) участвуют в изменениях системы ПОЛ/АОА при стрессе [67, 87, 121, 173], о влиянии нейромедиаторов парасимпатического отдела (ацетилхолин) на изменения интенсивности процессов ПОЛ информации у других авторов не найдено. К тому же, в литературных источниках, в основном, обсуждается вопрос о влиянии адреналина и ацетилхолина на ПОЛ организмов зрелого возраста, но в возрастном аспекте при сравнении организмов зрелого и старого возраста информации не достаточно. При этом ряд заболеваний, связанных с вынужденной гипокинезией организма (травмы, постинсультные состояния), сопровождается активацией ПОЛ, особенно - у пациентов пожилого возраста.

В литературе имеются данные о синтетических препаратах, адресно-ориентированных на устранение в организме многочисленных конкретных нозологий, вызванных иммобилизационным стресс-воздействием [65, 155, 175], и активацией ПОЛ [34, 90, 97], но слабо разработан вопрос о воздействиях на стресс-реакцию, как единую этио-патофизиологическую основу этих патологий. У ряда авторов обсуждается вопрос об адаптагенных и антиоксидантных свойствах нейрометаболита мелатонина при экстремальных

воздействиях, и в частности, при вынужденной иммобилизации организма [7, 26, 118, 132, 158]. Мелатонин является производным аминокислоты L-триптофан, образование которого в организме может усиливаться под воздействием никотиновой кислоты. Никотиновая кислота по принципу отрицательной обратной связи блокирует ключевой фермент метаболизма L-триптофана – триптофан-2,3-диоксигеназу (КФ1.13.11.11). В результате чего метаболизм L-триптофана может переключаться на серотониновый путь, с увеличением в организме его продуктов, таких как серотонин и мелатонин с проявлением адаптагенного и антиоксидантного эффектов [197, 200, 210, 222]. У других авторов мало информации о совместном влиянии L-триптофана и никотиновой кислоты на изменения в системе ПОЛ/АОА и липидного состава крови, вызванных стресс-воздействием, особенно в возрастном аспекте.

Цель работы. Выявить возрастные особенности изменений системы «перекисное окисление и антиокислительная активность» в организме крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и в условиях коррекции нейромедиаторами.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние иммобилизационного стресс-воздействия на изменения интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиокислительной активности (АОА) в периферической крови и костном мозге крыс зрелого и старого возраста.
2. Исследовать действие адреналина и ацетилхолина на изменения интенсивности процессов ПОЛ и АОА при иммобилизационном стресс-воздействии в периферической крови и костном мозге крыс зрелого и старого возраста.
3. Изучить действие адреналина и ацетилхолина на изменения интенсивности процессов ПОЛ в миелокариocyтах зрелых и старых крыс *in vitro*.
4. Определить влияние сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты на изменения активности процессов ПОЛ и АОА в системе крови, печени и головном мозге у крыс зрелого и старого возраста при иммобилизационном стресс-воздействии.
5. Оценить действие сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты на

изменения липидного и липопротеидного состава периферической крови крыс зрелого и старого возраста при иммобилизационном стресс-воздействии.

Научная новизна. Было выявлено, что иммобилизационное стресс-воздействие вызывает фазные изменения процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиокислительной активности (АОА) в системе крови крыс, которые соответствуют стадиям стресс-реакции, с увеличением возраста у старых крыс активация ПОЛ происходила на 6 часов раньше, чем у зрелых крыс.

Установлена индуцирующая роль адреналина и ацетилхолина в активации ПОЛ в межклеточной среде костного мозга с последующим увеличением ПОЛ в миелокариocyтах и периферической крови. Впервые показано, что при стресс-воздействии в системе крови крыс адреналин приводил к ускорению активации процессов ПОЛ и АОА, а ацетилхолин, напротив - вызывал замедление. В исследованиях *in vitro* впервые показано, что с возрастом уменьшался вклад парасимпатической нервной системы и увеличивался вклад симпатической нервной системы в активацию ПОЛ в миелокариocyтах.

Впервые были продемонстрированы антиоксидантные свойства сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты. Никотиновая кислота, действуя на метаболизм L-триптофана, увеличивала неферментативную антиокислительную защиту организма крыс, особенно в зрелом возрасте. Впервые выявлено гиполипидемическое действие сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты в условиях стресса, особенно в старом возрасте.

Практическая значимость работы. Полученные результаты позволят в клинике с помощью сочетания L-триптофана и никотиновой кислотой превентивно корректировать ряд патологических состояний организма (травмы, постинсультные состояния, дегенеративные заболевания опорно-двигательного аппарата), сопровождающихся вынужденной иммобилизацией и активацией ПОЛ у пациентов, с учетом их возраста. Результаты исследования могут быть использованы при разработке новых методов увеличения резистентности организмов зрелого и старого возраста к действию различных экстремальных факторов. Обоснована целесообразность возможного применения сочетания L-

триптофана и никотиновой кислоты в качестве антиоксидантного и гиполипидемического, профилактического средства у лиц зрелого и пожилого возраста.

Положения, выносимые на защиту:

1. Стресс-воздействие вызывает фазные изменения процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиокислительной активности (АОА) в системе крови крыс, которые соответствуют стадиям стресс-реакции; с увеличением возраста у старых крыс происходит более ранняя активация процессов ПОЛ.
2. Нейромедиаторы вегетативной нервной системы участвуют в изменениях интенсивности ПОЛ: с возрастом в системе крови крыс наблюдается ослабление влияния парасимпатической нервной системы и усиливается - симпатической, что может приводить к возраст-зависимым изменениям интенсивности процессов ПОЛ при стресс-воздействии.
3. Влияние сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Трп+Н.к.) при стресс-воздействии на зрелых и старых крыс проявляется в виде антиоксидантного эффекта; с увеличением возраста у старых крыс сочетание Трп+Н.к. нормализует липопротеидный состав крови, демонстрируя гиполипидемический геропротективный эффект.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе на кафедрах патологической физиологии и биохимии ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, в научно-исследовательской деятельности лаборатории антивозрастных технологий ГИИ СО «Институт медицинских клеточных технологий» (г. Екатеринбург).

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на: 54 научной конференции студентов и молодых ученых УГМА «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (Екатеринбург 1999); 55 научной конференции студентов и молодых ученых УГМА «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (Екатеринбург, 2000); Межобластной научно-практической конференции «Геронтология и гериатрия. Медицинское обслуживание ветеранов войн»

(Екатеринбург, 2000); 6 Европейском конгресс по клинической геронтологии (Москва, 2002); Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной биохимии» (Киров, 2007); Научно-практической конференции и школы с международным участием «Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии: от теории к практике», посвященной памяти академика В.В. Фролькиса (Киев, 2013); Российской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской биохимии и клинической лабораторной диагностики», посвященной памяти профессора Д.М. Зубаирова (Казань, 2013); 3 международной конференции «Генетика старения и долголетия» (Сочи, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 работ, из них 4 в журналах рекомендованных ВАК. Получено положительное решение о выдаче патента на промышленный образец (заявка № 2014504302, схема «Возрастные особенности участия симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы в изменении интенсивности процессов ПОЛ системы крови крыс при иммобилизационном стресс-воздействии»).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 168 страницах текста, содержит 42 таблицы и 27 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, трех глав собственных исследований, выводов, заключения и списка литературы, включающего 186 отечественных и 145 иностранных публикаций.

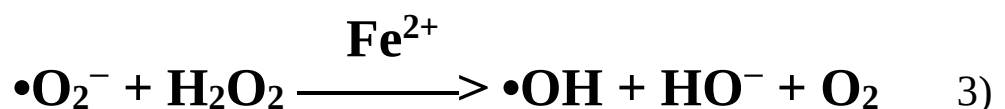
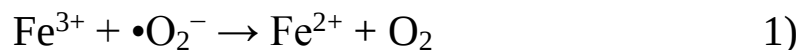
ГЛАВА 1 - ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 - Перекисное окисление липидов и антиокислительная активность в организме животных и человека в норме

СРО (свободно-радикальное окисление) – это сложный, многоступенчатый физиологический процесс, обеспечивающий регуляцию клеточной активности и имеющий несколько взаимосвязанных, взаимодополняющих друг друга механизмов.

ПОЛ (перекисное окисление липидов) – это одна из разновидностей СРО процессов, в качестве субстрата преимущественно использует ненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов биологических мембран с образованием циклических эндоперекисей и гидроперекисей [21, 32]. Перекисное окисление усиливается при снижении антиоксидантной активности клетки, повышении содержания полиненасыщенных жирных кислот, при избытке катехоламинов, гипоксии и ишемии [10, 40, 50].

Одним из самых сильных кислородсодержащих окислителей, образующихся в организме, можно назвать гидроксильный радикал $\cdot\text{OH}$, который образуется в химической реакции открытой Габером и Вейсом:



(Реакция Габера – Вейса)

Кроме того, реакция Габер-Вейса катализируется ионами металлов с переменным зарядом, которые должны присутствовать в клетке, по крайней мере, в следовых количествах [136, 151].

Под влиянием индуцирующих перекисное окисление липидов (ПОЛ) агентов образуется радикал полиненасыщенной жирной кислоты (ПНЖК). При делокализации в радикалах электронной плотности образуются конъюгированные диены, которые легко взаимодействуют с кислородом, образуя перекисные радикалы. Дальнейшее разветвление цепи ПОЛ происходит благодаря взаимодействию перекисных радикалов с НЖК, в

результате чего образуются гидроперекиси и новые радикалы. Гидроперекиси жирных кислот, в свою очередь восстанавливаются до соответствующих гидроокисей с помощью фермента неселеновой глутатионпероксидазы.

В другом случае возможно расщепление перекиси фосфолипида с появлением карбонильной группы в его молекуле и образованием свободного альдегида. Вторичная радикальная атака на карбонил-фосфолипид с дальнейшим присоединением кислорода приводит к образованию альдегидгидроперекиси, которая отщепляет молекулу малонового диальдегида (МДА) наиболее известного из продуктов ПОЛ [30, 257].

ПОЛ - это цепной, нарастающий во времени разрушительный процесс, в который вовлекается не только мембрана клетки, но и вся клетка. Таким образом, клетке необходим фактор, сдерживающий и регулирующий ПОЛ. Этим фактором, действующим практически на всех стадиях процесса, является «структурный антиоксидантный эффект», который рассматривается как комплекс свойств липидного бислоя мембран, ограничивающих доступность активных форм кислорода, катализаторов ПОЛ, радикальных интермедиатов к полиеновым ацилам фосфолипидов [57].

В организме присутствуют вещества - антиоксиданты, реагирующие с перекисными радикалами, вызывая их инактивацию [90, 125, 180]. Перечень естественных антиоксидантов включает гидрофобные (витамины Е, А, К стероидные гормоны) и гидрофильные (витамины С, Р, РР, производные хинона). Благодаря этому защита от окисляющих агентов одновременно может осуществляться как в водной среде, так и в липидной фазе.

Ферментативная система антиоксидантной защиты организма представлена следующей группой ферментов [86]:

- а) супероксиддисмутаза, которая обеспечивает превращение высокоактивного супероксидного аниона ($\bullet\text{O}_2^-$) в менее активный окислитель - перекись водорода (H_2O_2);
- б) глутатионпероксидазы, которые катализируют оксидоредукцию между восстановленным глутатионом и гидроперекисями жирных кислот, обезвреживая последние путем их превращения в жирные окисикислоты:



Кроме того, одна из глутатионпероксидаз (Se-зависимая) разрушает пероксид водорода:



G-SH – восстановленный глутатион; G-S-S-G – окисленный глутатион

Окисленный глутатион восстанавливается глутатионредуктазой с использованием НАДФН₂, образующегося в пентозофосфатном цикле;

в) каталаза и пероксидаза, разрушающие H₂O₂.

ПОЛ является нормальным метаболическим процессом, широко представленным во всех органах и тканях организма [25, 107, 261]. Через стадию перекисных производных полиненасыщенных жирных кислот осуществляется биосинтез простагландинов; образование гидроперекиси холестерина является одним из звеньев синтеза некоторых стероидных гормонов; с помощью микросомальной системы ПОЛ происходит регуляция активности мембрансвязанных ферментов эндоплазматической системы [25, 85].

Свободные радикалы являются активными участниками большого числа химических реакций протекающих в живых клетках, играют важную роль в ферментативных процессах. Поэтому ПОЛ при достаточно низкой его интенсивности относится к нормальным метаболическим процессам.

С процессами ПОЛ связаны такие биологические явления, как окислительное фосфорилирование в митохондриях, генерация и проведение нервного импульса, клеточное деление, механизмы регуляции мембранной проницаемости и активности мембранных ферментов [92, 157].

В норме, благодаря влиянию общей антиокислительной активности (АОА) тканей, уровень ПОЛ поддерживается в организме на достаточно низком уровне. Минимальные значения ПОЛ у людей и животных наблюдаются в сыворотке крови в среднем возрасте, максимум в молодом и старческом возрасте. Более низкий уровень ПОЛ отмечается у женщин по сравнению с мужчинами [71, 202]. Как правило, более высокий уровень АОА и низкий ПОЛ характерен для органов с интенсивным метаболизмом, в частности для

головного мозга. Высокая интенсивность АОА и низкий уровень ПОЛ наблюдаются в периферической крови и костном мозге [108]. В печени уровень ПОЛ выше, а АОА – ниже, чем в периферической крови и костном мозге [132]. Высокая защищенность системы крови антиоксидантами делает ее достаточно устойчивой к воздействию экстремальных факторов и возрастных изменений.

ПОЛ участвует в трансформации жирных кислот в углеводы [16], интенсивность ПОЛ оказывает влияние на активность мембранных белков [60, 124]. Особое значение придается липопероксидам в регуляции синтеза ДНК, РНК и белковых макромолекул [4, 52]. Было показано, что в физиологических условиях липопероксиды участвуют в клеточном метаболизме и поддержании постоянства внутренней среды организма [101, 128].

Значение ПОЛ:

- 1) модификация биологических мембран, их физиологическое обновление и влияние на проницаемость [25];
- 2) участие в метаболизме оксида азота в норме и патологии [162];
- 3) регуляция окислительного фосфорилирования [34];
- 4) участие в биосинтезе простагландинов, стероидных гормонов, тромбоксанов, лейкотриенов [4];
- 5) контролирование клеточного деления [43, 107];
- 6) участие в обмене холестерина [92, 110, 114];
- 7) участие процессов ПОЛ в воспалении и антимикробной системе фагоцита [54, 151].

1.2 - Перекисное окисление липидов и антиокислительная активность в организме животных и человека при экстремальном воздействии

Контроль клеток за процессами перекисного окисления липидов (ПОЛ) не всегда находится на должном уровне. При экстремальных воздействиях, когда происходит напряжение многих биохимических процессов, регуляция клетками уровня ПОЛ снижается и его интенсивность выходит за пределы нормы [121, 261]. Одной из характеристик патологического состояния организма можно назвать некоторое физиологическое напряжение в работе органов или клеток, которое влечет за собой увеличение повреждающего

действия свободных радикалов.

Было выяснено, что в красном костном мозге на ранних сроках (несколько часов) воздействия экстремальных факторов происходит увеличение уровня ПОЛ. При использовании более длительного экстремального воздействия (до нескольких суток) в костном мозге, происходит снижение активности ПОЛ за счет роста антиокислительной активности (АОА), при этом усиливается его пролиферативная активность [99, 108, 182, 183].

Переокисное окисление липидов и его продукты приводят к нарушению проницаемости мембран, вызывают разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях, снижают чувствительность рецепторных белков и активность примембранных ферментов [95]. Изменение проницаемости мембран ведет к отеку клеточных структур, в ядерных структурах клетки происходит нарастание ошибок генетического аппарата, в митохондриях из-за разобщения окислительного фосфорилирования нарушается энергетический обмен, что дополнительно усиливает процессы ПОЛ в клетке [118, 130, 164]. Повреждение мембран лизосом, пероксисом, микросом и других везикулярных структур с активными ферментами, способствует освобождению этих энзимов и гибели клеток [44, 138].

Усиление ПОЛ в крови человека и животных сопровождается изменением эритроцитарного состава [33]. Действие свободных радикалов изменяет физико-химические свойства мембран, увеличивая ее проницаемость, кроме того, окисление белковых компонентов способствует наработке метгемоглобина. Это сопровождается снижением резистентности эритроцитов к повреждающим агентам и свободным радикалам [68, 215]. В литературе отмечена связь между ростом ПОЛ в крови и снижением перекисной и осмотической резистентности в эритроцитах [17, 100, 144].

Активация ПОЛ при экстремальных воздействиях является типичным процессом в развитии общего адаптационного синдрома [101, 174]. Активация ПОЛ и увеличение количества его продуктов при иммобилизационном стресс-воздействии связано с интенсивностью регенераторных процессов. Было

отмечено, что при экспериментальной активации процессов ПОЛ (смесь соли Fe^{2+} с аскорбиновой кислотой) происходит увеличение включения ^3H -тимидина в ДНК миелокариоцитов [108]. Активация ПОЛ в миелокариоцитах на фоне экстремального воздействия, занимает существенное место в активации гемопоэза, так как увеличивает доступность кроветворных клеток для гуморальных активаторов гемопоэза и изменяет проницаемость мембраны для доступа предшественников синтеза нуклеиновых кислот [99, 183].

Введение в организм животных олеиновой кислоты в окисленном состоянии приводило к ускорению деструкции старых эритроцитов приводящей к активации регенерации в кроветворной ткани, что дополнительно подтверждает участие процессов ПОЛ/АОА в регуляции гемопоэза [116, 146]. Экстремальное воздействие приводит к накоплению продуктов ПОЛ в крови, что способствует усилению эритродиереза и повышенному выходу продуктов, активирующих эритропоэз [58, 88, 159].

В литературе отмечено, что экстремальные воздействия приводят к активации процессов ПОЛ, сопровождающихся серией физико-химических и структурно-функциональных нарушений в мембранах [56, 65]. Кроме того, при изучении многими авторами стресса различной этиологии отмечены явления инактивации АОА и усиления ПОЛ [25, 69, 181].

1.3 - Возрастные особенности изменения процессов перекисного окисления липидов и антиокислительной активности в организме животных и человека

С возрастом происходит постепенное увеличение количества продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [7, 10, 133, 161, 238, 298] и уменьшение антиокислительной активности (АОА) в основном ферментативного типа [5, 23, 73, 112, 289, 306]. Этим процессам многие авторы приписывают главную роль в старении человека и животных. Основными причинами, уменьшающими ферментативную АОА, являются снижение генетического контроля над синтезом антиокислительных ферментов и накопление повреждений в генах кодирующих эти белки [113, 320]. Кроме того, с возрастом может появляться дефицит в антиоксидантах неферментативной природы (витамины А, Е, С).

Отмечено, что при старении происходит увеличение повреждающего действия ПОЛ и его продуктов [75, 82, 97, 159, 178, 191, 243]. Это приводит к накоплению неспецифических модификаций белков и ферментов, увеличению проницаемости и текучести мембран, росту повреждения в клеточных компартментах, к повреждению митохондрий и электрон-транспортному дисбалансу [11, 123, 138, 238]. В ряде литературных источников показано, что с возрастом происходит нарастание в белковых единицах количества дисульфидных связей и увеличение в сыворотке крови количества окисленных белков, вызванных повышенной интенсивностью процессов ПОЛ [49, 64, 123].

Отмечено, что с возрастом наблюдается качественное и количественное изменение мембранных липидов, состав которых в зависимости от вида и количества жирных кислот способен активировать или замедлять ПОЛ, проявлять про- или антиоксидантные свойства [21, 108].

Ряд авторов отмечают наличие возраст-зависимого увеличения содержания насыщенных жирных кислот и холестерина, относящихся к группе трудноокисляемых компонентов, количество легкоокисляемых полиненасыщенных жирных кислот уменьшается [29, 169]. С одной стороны, это оказывает тормозящее действие на распространение липопероксидации в мембранах и компартментах клеток, с другой стороны – способствует снижению проницаемости мембран и увеличению предрасположенности к атерогенным изменениям сосудов [74, 160, 216].

Известно, что уровень ПОЛ в различных тканях и органах при экстремальном воздействии и старении активируется с различной силой и интенсивностью [93, 313]. С возрастом в печени старых крыс наблюдается повышенный уровень ПОЛ [47, 69, 329] и сниженное количество аскорбиновой кислоты [63, 296]. При исследовании старения на экспериментальных животных отмечалось увеличение липопероксидации в скелетных мышцах, селезенке, гипофизе и эритроцитах; отсутствие изменений – в почках и коре головного мозга и уменьшение – в сердце, надпочечниках и легких [75, 82, 179].

Многие исследователи отмечают наличие изменений в системе

ПОЛ/АОА периферической крови при старении, в основном, имеет место активация процессов ПОЛ [80, 148, 172, 273] и снижение ферментативной и неферментативной АОА [1, 20, 68, 218]. В эритроцитах старых животных в большей степени представлены продукты ПОЛ, увеличено содержание малонового диальдегида, количество гидроперекисей фосфолипидов и диеновых конъюгатов [68, 186, 191].

С увеличением возраста в эритроцитах наблюдается снижение активности ферментативной АОС, происходит уменьшение активности каталазы, супероксиддисмутазы и группы ферментов метаболизирующих глутатион [117], снижается количество восстановленной формы глутатиона и увеличивается - окисленной. Также, в старых эритроцитах, снижается резерв неферментативной АОА, наблюдается уменьшение содержания α -токоферола [63, 177] и церулоплазмينا [45].

Однако в современных литературных источниках имеет место противоположная точка зрения, в которой отмечается отсутствии значимых изменений показателей ПОЛ в системе крови при старении [189]. Ряд авторов указывает на достоверное снижение интенсивности процессов ПОЛ с увеличением возраста, возможно связанное с изменением жирнокислотного состава мембран [216]. Возрастные изменения системы АОА, так же неоднозначны, как и изменения в системе ПОЛ. Отдельные авторы обнаружили повышение ряда параметров АОА в периферической крови при старении [69, 141, 216].

При постановке экспериментов с ускоренным старением на животных было показано, что ПОЛ ускоряет процессы старения в организме [6, 22], а применение антиоксидантов вызывало замедление развития старения [72, 122, 180, 248]. Воздействие антиоксидантов приводит к изменению физико-химических свойств мембран с увеличением ненасыщенности и текучести липидов, а также влияют на активность мембранных рецепторов и околосмембранных энзимов. Длительное воздействие антиоксидантами способно замедлять физиологическое старение, замедлять процессы метилирования и накопление повреждений в ДНК, предотвращать появление

повреждений в генетическом аппарате продуктами ПОЛ. Антиоксиданты обладают способностью подавлять процесс миграции и пролиферации стволовых кроветворных клеток [111, 139, 145]. Таким образом, введение антиоксидантов вызывает снижение уровня ПОЛ как в отдельных органах, так и в организме в целом, что в итоге приводит к увеличению продолжительности жизни и замедлению старения.

1.4 - Иммобилизация, как разновидность экстремального психо-эмоционального стресс-воздействия у животных и человека

В 1936 году Ганс Селье разработал теорию стресса, изложив ее в статье «Синдром, вызываемый разными повреждающими агентами». Канадский ученый определил стресс, как неспецифическое напряжение живого организма, возникающее в ответ на раздражитель.

В более узком понимании стресс означает «общую неспецифическую нейрогуморальную реакцию, возникающую в организме в условиях, угрожающих нарушением гомеостаза» [38]. Активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) может рассматриваться как компонент стресс-реакции.

Известно, что изменения в организме при стрессе носят стадийный характер [147]. Г. Селье описал три стадии этого состояния - тревога, резистентность и истощение. В дальнейшем, в пределах стадии тревоги, была выявлена дополнительная фаза - фаза срочной адаптации (шок, противошок), которая, вероятно, тоже имеет сложную структуру [2, 19, 89, 129, 167].

Последующее развитие учения о стрессе, привело к существенному уточнению и конкретизации представлений о механизмах стресса, включающих, как теперь известно, активацию симпатoadреномедуллярной, а также холин-, гистамин- и серотонин-эргической систем [53, 101, 119, 134, 182, 208].

В настоящее время существует несколько моделей стресса. Они включают помещение экспериментальных животных на изолированную площадку в центре водной преграды, изоляцию животных друг от друга, электрокожное раздражение, круглосуточное закрытие глаз животных особыми шорами, фиксация животных за дорзальную шейную складку и т.д. [116, 119,

154, 174, 229, 286, 324]. Среди моделей стрессового воздействия на организм наиболее целесообразными представляются те из них, в которых не происходит физического повреждения тканей. Наиболее распространена и доступна для применения модель гиподинамического стресса – иммобилизация [28, 182]. При использовании иммобилизации возникают фазные изменения, характерные для психо-эмоционального стресса, активация симпатoadреналовой системы, изменения в системе крови, надпочечниках и центральной нервной системе (ЦНС) [8, 27, 116, 214, 326]. Стандартность изменений, отсутствие дополнительных повреждающих факторов и простота технического осуществления делают иммобилизацию наиболее целесообразной моделью стрессового воздействия.

В тех случаях, когда стресс развивается под влиянием дистантных (ожидания опасности, угрозы, страха, опасения боли) или (применительно к человеку) психоэмоциональных воздействий, активация стресс-реализующих систем может развиваться при участии высших отделов головного мозга, без первичной активации ПОЛ [15, 225, 264, 276]. Иными словами, при психоэмоциональном стрессе роль продуктов ПОЛ, как первичного медиатора стресса, может быть небольшой или даже нулевой. Однако это не исключает развития активации ПОЛ в качестве вторичного медиатора на последующих этапах реализации стресс - реакции.

Типичными для стресс-реакции организма человека и млекопитающих Г.Селье считал активацию гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы (с усилением секреции кортикотропина, гипертрофией коры надпочечников и гиперсекрецией кортикостероидов) [135, 232, 237], инволюцию тимико-лимфатической системы [8, 235, 281], возникновение желудочных язв и кровотечений (так называемая триада Селье). Показано, что повторяющиеся стрессовые воздействия ведут к глубоким изменениям структуры и функции клеток мозгового вещества надпочечников, что отражается сдвигами в продукции кортикостероидов [18, 135, 280]. Также значительные изменения, свидетельствующие о стрессовом повреждении органов, выявляются в сердечно-сосудистой системе [244, 299, 304] и ЦНС [226, 270, 316].

При эмоционально-болевым стрессе скорость синтеза РНК и белков резко изменяется. Немедленно, после прекращения стрессового воздействия, скорость синтеза РНК и белков понижается, в дальнейшем она восстанавливается и превышает контрольные величины [102, 140, 236, 323]. В условиях стресса синтез белка подвергается не только количественным, но и качественным изменениям, при этом синтезируется целая группа так называемых «стрессорных белков» [104, 163, 242, 245]. Изменения липидного обмена заключаются в повышении фракции липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и очень низкой плотности (ЛПОНП), снижении липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), повышении атерогенности крови [20, 75, 161].

1.5 - Возрастные особенности стресс-реакции в организме животных и человека

При старении и в условиях стресса, наиболее существенные различия были обнаружены в активности различных ферментных систем. При стрессе у животных старого возраста возникает наиболее выраженное нарушение активности редуктаз печени, по сравнению с животными зрелого возраста [288, 302]. В условиях стресса с возрастом усиливается повреждение ткани миокарда, что связано с возрастным снижением активности некоторых ферментов катаболизма эндогенных альдегидов и, как следствие, с нарушением синтеза аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) в миокардиоцитах [190, 233, 287].

Поперечнополосатая мышечная ткань также подвержена возрастным изменениям при стрессе. Так, у пожилых людей при стрессе более выражено окислительное повреждение сократительных белков миоцитов [37, 213, 322] и нарушены процессы их восстановления после иммобилизации [137].

Утилизация продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тканях старых животных сопровождается образованием Шиффовых оснований, что приводит к модификации внутриклеточных макромолекул и, таким образом, облегчает стресс - индуцированное повреждение клеток. Напротив, в тканях животных зрелого возраста утилизация малонового диальдегида (МДА) и других продуктов ПОЛ не приводит к накоплению Шиффовых оснований, что лимитирует внутриклеточные стрессовые повреждения [159, 228, 331].

Данные литературы относительно изменений в системе крови при действии стресса отличаются противоречивостью. Система крови, как и другие системы, подвергаясь возрастной инволюции, теряет резервы адаптации, необходимые для адекватного ответа на стресс [74, 75, 148]. Однако в некоторых исследованиях показана другая точка зрения, где отмечается отсутствие достоверных изменений в системе гемопоза в стрессовых ситуациях с увеличением возраста [97, 196, 246, 274]. Существующие противоречия исследователи связывают как с выраженной неоднородностью исследуемых групп, так и с отсутствием в литературе стандартизованных протоколов для проведения сравнительных исследований такого рода.

1.6 - Участие медиаторов адренергической системы в реализации стресс-реакции при экстремальных воздействиях

Катехоламины, в том числе адреналин, синтезируются в мозговом веществе надпочечников и нервной ткани из тирозина. Последовательность реакций:

- 1) гидроксилирование тирозина до диоксифенилаланина;
- 2) декарбоксилирование диоксифенилаланина до дофамина;
- 3) гидроксилирование дофамина до норадреналина.

Гидроксилирование тирозина является этапом биосинтеза, ограничивающим его скорость. Адреналин образуется в результате N-метилирования норадреналина в мозговом слое надпочечников.

Основными метаболитами катехоламинов являются 3-метокси- 4-гидрокси-ванилилминдальная кислота (из норадреналина и адреналина) и гомованилиновая кислота из дофамина. Катехоламины депонируются в секреторных пузырьках мозгового слоя надпочечников и окончаниях симпатических нервов и высвобождаются при деполяризации клеток.

Катехоламины в норме обладают антиоксидантной активностью [272], являясь своеобразными «ловушками» свободных радикалов и активируя ряд антиокислительных ферментов. В частности показано, что ряд катехоламинов, включая адреналин и дофамин, оказывают антиоксидантное действие при

вызванной активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) в ткани мозга [131, 272, 309], причем этот эффект является прямым, а не опосредованным через нейротрансмиссию.

В экспериментальной модели иммобилизационного стресс–воздействия в ряде органов и тканей было выявлено существенное повышение концентрации норадреналина [182, 252, 254, 309]. Системное действие катехоламинов вызывает патологическую вазоконстрикцию с развитием ишемии, повышением текучести мембран клеток и последующей активаций ПОЛ [40, 75]. Одним из механизмов влияния катехоламинов, может быть аутоокисление адреналина в ходе его избыточной и продолжительной выработки, что связано с истощением систем его деградации (моноаминоксигеназного пути и катехол-О-метилтрансферазного), при этом сама молекула катехоламина становится источником свободных радикалов [173, 209, 253, 284]. Катехоламины как гормоны, являются одним из основных активаторов усиленного метаболического ответа центральной нервной системы (ЦНС) на повреждение ткани мозга, реализующие свой эффект при воздействии на адренорецепторы мозга через аденилатциклазный механизм, приводя к образованию циклического АМФ из АТФ [219, 259, 278].

Установлено, что при иммобилизационном стрессе или электрошоковом повреждении активация симпатoadреналовой системы более выражена, нежели при эмоциональных видах стресс-реакции, что сопровождается более генерализованным выбросом катехоламинов в ЦНС [204, 260].

Повышение уровня норадреналина в подкорковых структурах головного мозга изменяет психофизиологическую реакцию при стрессе (повышение тревожности и депрессии) [199]. Катехоламины при хроническом стрессе ингибируют продукцию антител, однако, данный эффект ослабляется регулярными физическими нагрузками [220].

Однократное введение в организм симпатомиметических веществ вызывает кратковременную реакцию со стороны периферической крови, происходящую за счет функции депо, в виде увеличения количества эритроцитов, гемоглобина, ретикулоцитов и общего объема крови [182, 183,

250]. Длительное многократное введение в организм адренергических веществ, вызывает стойкое увеличение в периферической крови содержания эритроцитов, гемоглобина и ретикулоцитов, а также стимуляцию и гиперплазию эритроидного ростка костного мозга [182, 192, 293].

Одной из причин активации ПОЛ при стрессе считают выброс катехоламинов [102, 187, 227]. Одним из механизмов влияния катехоламинов, может быть аутоокисление адреналина в ходе его избыточной и продолжительной выработки, что связано с истощением систем его деградации [173, 253].

При сильных и длительных напряжениях, по истощении резервной мощности антиокислительной системы (АОС), активация ПОЛ приобретает выраженный характер и ведет к патологии [86, 141]. Известно, что при любом экстремальном воздействии развивается дозозависимая активация стресс-реализующих систем, обуславливающая поступление в кровь повышенного количества катехоламинов и кортикостероидов [183, 231, 271]. Катехоламины и особенно глюкокортикоиды обладают антиокислительной активностью [272, 309], это дает основание рассматривать мобилизацию систем нейрогуморальной регуляции, как аварийную реакцию, развивающуюся по механизму отрицательной обратной связи в ответ на активацию ПОЛ. Если эта реакция не ликвидирует последствий окислительного сдвига, количество продуктов ПОЛ вновь начинает аутокаталитически нарастать после некоторого латентного периода, длительность которого лимитируется истощением резерва антиоксидантов [23, 69, 71].

По современным представлениям, гиперпродукция катехоламинов вызывает вторичную активацию ПОЛ [102, 271]. Механизм этой реакции связан с особенностями метаболизма катехоламинов, идущего несколькими параллельными путями. В физиологических условиях главный путь инактивации катехоламинов - метилирование при участии катехол-О-метилтрансферазы (80-90% катехоламинов превращается в метанефрин и норметанефрин). Значительно меньшую роль в инактивации катехоламинов играет окислительное дезаминирование с участием моноаминоксидаз.

Инактивация, идущая по пути окислительного распада с образованием адренохрома через промежуточную стадию семихинного радикала, в норме играет второстепенную роль. Наконец, незначительная часть циркулирующих катехоламинов инактивируется путем образования неактивных парных соединений с серной и глюкуроновой кислотами [10, 194].

При высоких концентрациях катехоламинов в крови, как и при свободном доступе кислорода вне организма, свободно-радикальные интермедиаты катехоламинов выступают в роли инициаторов цепей липопероксидации и становятся фактором патогенеза [279, 292]. Имеющаяся литература подтверждает прямое участие продуктов ПОЛ в реализации неспецифического комплекса повреждений клеточных мембран и в нарушении основных мембранных процессов [22].

1.7 - Участие медиаторов холинэргической системы в реализации стресс-реакции при экстремальных воздействиях

Парасимпатические нейроны и преганглионарные симпатические нейроны синтезируют ацетилхолин из холина и ацетил-КоА при участии фермента холинацетилтрансферазы (КФ 2.3.1.6) [310]. Ацетилхолин депонируется в синаптических пузырьках и высвобождается при деполяризации. В пресинаптической щели, при участии фермента ацетилхолинэстеразы, происходит гидролиз ацетилхолина с образованием холина и ацетил-КоА, которые подвергаются обратному захвату и используются для нового цикла синтеза [328].

При стрессе происходит высвобождение ацетилхолина из эндотелия, что ведет к вазодилатации и снижению эффекта избыточной стимуляции катехоламинами [201, 265]. В тоже время, угнетение выделения ацетилхолина в синаптические щели [255] и снижение плотности Н-холинорецепторов на постсинаптической мембране [290] при стрессе утяжеляет психофизиологические расстройства.

Активность М - холинорецепторов коры головного мозга связана с процессами памяти и обучения [198, 241], поэтому снижение концентрации холинорецепторов [249, 255, 290], наблюдаемое при стрессе и ряде

патологических состояний, ухудшает процессы запоминания.

Ряд авторов отмечают участие холинэргических механизмов в регуляции кроветворения [206, 224]. Ацетилхолин вызывает выход лимфоцитов [311, 325] и эозинофилов [195, 256, 318] из костного мозга в периферическую кровь. *In vitro* ацетилхолин способен стимулировать созревание и дифференцировку эритроидных элементов костного мозга, а атропин угнетает эти процессы [251]. Ацетилхолин в условиях стресса вызывает активацию лейкопоза в костном мозге и усиливает их выход в кровеносное русло [262], а также вызывает вазодилатацию, усиливая кровообращение и снимая патологическую вазоконстрикцию, ведущую к ишемии [307].

Не исключается возможность того, что в холинэргической регуляции гемопоэза не последнюю роль играют структурные варианты фермента ацетилхолинэстеразы, обладающие собственным гемопоэз-индуцирующим эффектом [230]. Показана активация эритропоэза в костном мозге под действием ацетилхолинэстеразы [303, 314]. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы обладают выраженным антиоксидантным действием [258].

1.8 - Особенности влияния никотиновой кислоты на метаболизм L-триптофана в организме животных и человека

L-триптофан является незаменимой аминокислотой для человека и метаболизирует в организме двумя путями - кинурениновым и серотониновым [283].

Кинурениновый путь является наиболее интенсивным, более 95% всего количества L-триптофана вступает в окисление по кинурениновому пути и приводит к образованию рибонуклеотида никотиновой кислоты, а в конечном итоге и никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺). Серотониновый путь метаболизма L-триптофана составляет менее 1% в общем метаболизме этой аминокислоты и приводит к образованию нейротрансмитера серотонина (рисунок 1).

При метаболизме по серотониновому пути L-триптофан под действием фермента триптофан-5-моноксигеназы (КФ 1.14.16.4) метаболизирует до 5-гидрокси-L-триптофана, незначительная часть которого может вступать на

побочный путь метаболизма с образованием двух конечных продуктов – 6-гидроксикинуреновой кислоты и 4,6-дигидроксихинолина. В основном, 5-гидрокси-L-триптофан метаболизирует под действием ДОФА-декарбоксилазы (КФ 4.1.1.28) до нейромедиатора серотонина. Дальнейшие превращения серотонина возможны по трем основным путям.

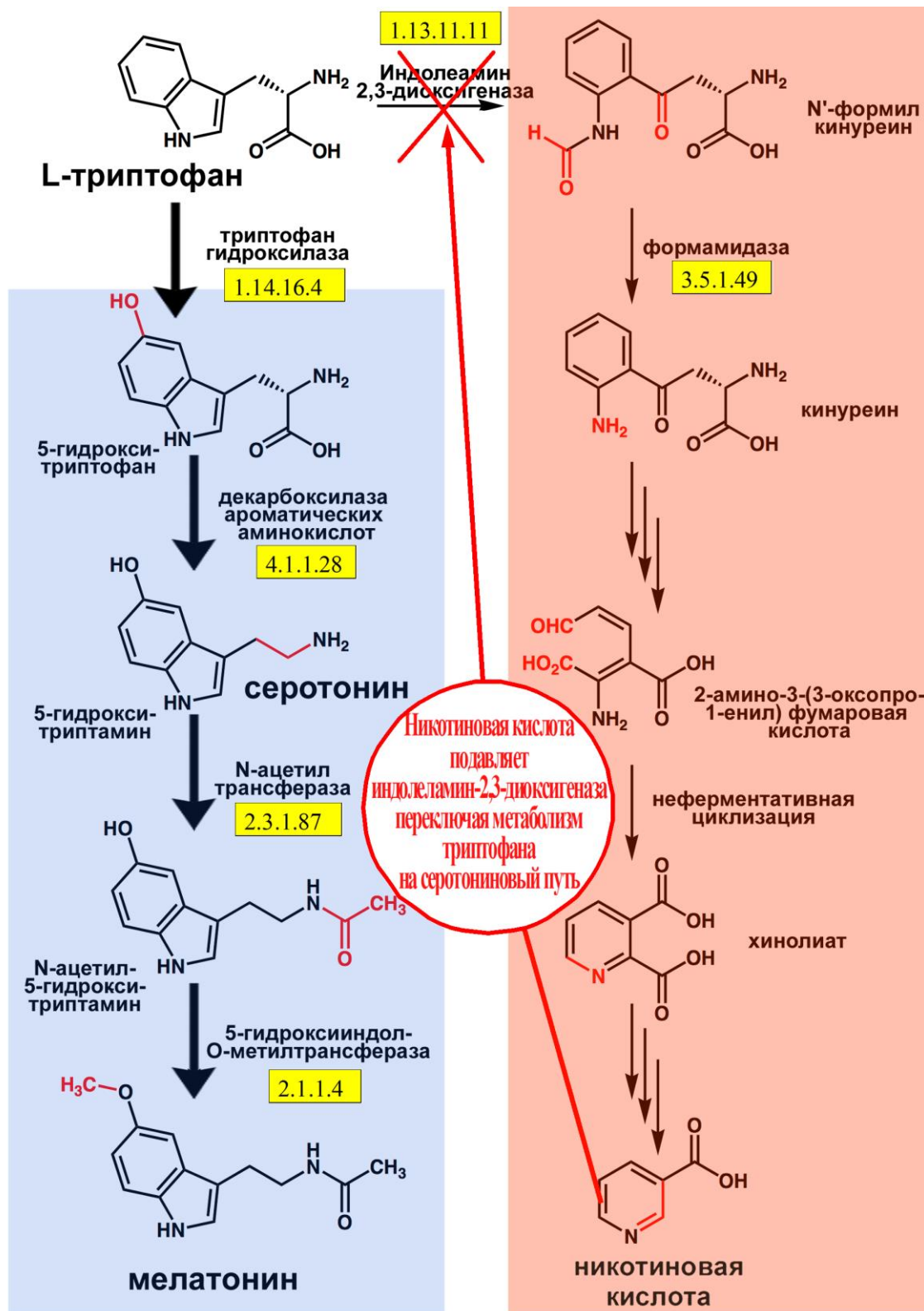


Рисунок 1 – Метаболизма L-триптофана в присутствии избытка никотиновой кислоты

Во-первых, под действием фермента моноаминоксидазы (КФ 1.4.3.4) из серотонина образуется 5-гидроксииндолилацетальдегид, который, в свою очередь, метаболизирует до двух конечных продуктов: 5-метоксииндолилацетата и 5-гидроксииндолилацетилглицерина.

Во-вторых, при участии фермента серотонинметилтрансферазы (КФ 2.1.1.49) серотонин превращается в N-метилсеротонин (также конечный продукт обмена).

Третий путь метаболизма серотонина включает образование мелатонина. На первом этапе, из серотонина под действием фермента арилалкиламин-N-ацетилтрансферазы (КФ 2.3.1.87) образуется N-ацетилсеротонин. На втором этапе, под действием фермента ацетилсеротонин-O-метилтрансферазы (КФ 2.1.1.4) из него образуется собственно мелатонин. Конечным продуктом метаболизма мелатонина является 6-гидроксимелатонин, который образуется из мелатонина под действием фермента из семейства цитохромов P450.

Промежуточные продукты обмена L-триптофана могут обладать модифицирующим действием на метаболизм этой аминокислоты, влияя на активность ферментных систем путем конкуренции за субстрат. Было проведено масштабное исследование на крысах по изучению влияния избыточного количества никотинамида в рационе на метаболизм L-триптофана [222, 308, 317]. Авторы показали, что при избыточном поступлении никотинамида не выявляется никаких изменений в кинурениновом пути метаболизма L-триптофана, вплоть до образования полуальдегида аминокарбоксимуконата, что свидетельствует о независимости данной части метаболического пути от концентрации никотинамида. При этом было обнаружено, что содержание хинолиновой кислоты в моче (продукта спонтанной циклизации полуальдегида аминокарбоксимуконата) повышается с увеличением дозы никотинамида в рационе. Авторы выдвинули две гипотезы для объяснения данного феномена. Первая заключается в том, что никотинамид и хинолиновая кислота конкурируют за общий субстрат – 5-фосфорибозил-1-пирофосфат. Вторая же гипотеза состоит в том, что один из продуктов метаболизма никотинамида ингибирует активность фермента альфа-амино-

бета-карбоксимуконат-эпсилон-полуальдегид-декарбоксилазы, что приводит к снижению активности метаболизма L-триптофана по пути образования ацетил-КоА и увеличению спонтанного образования хинолиновой кислоты. Однако, учитывая, что в этой же работе показано, что избыточное поступление никотинамида не влияет на экскрецию с мочой таких метаболитов L-триптофана, как кинуреновая кислота, антраниловая кислота и ксантуреновая кислота, наиболее вероятной остается первая гипотеза о конкуренции хинолиновой кислоты и никотинамида за общий субстрат.

С другой стороны, американскими исследователями ранее было показано [321], что введение человеку препаратов никотиновой кислоты замедленного высвобождения (ретардированные формы никотиновой кислоты) профилактирует приступы мигрени. Учитывая, что в патогенезе мигрени большое внимание уделяется дефициту серотонина [55, 217, 263], авторы выдвинули гипотезу, что введение никотиновой кислоты ингибирует кинурениновый путь метаболизма L-триптофана и способствует переключению метаболизма этой аминокислоты на серотониновый путь.

Таким образом, никотиновая кислота и никотинамид неоднозначно влияют на обмен L-триптофана. Если никотинамид просто конкурирует с хинолиновой кислотой за общий субстрат, то никотиновая кислота приводит к ингибированию кинуренинового пути с активацией серотонинового пути, что может оказывать существенное влияние на активность метаболических процессов в ЦНС. Однако данные литературы представляют собой единичные исследования и систематическая оценка этих данных в настоящее время не представляется возможной.

Кроме того, на образование никотинамида из L-триптофана влияет не только изменение его концентрации в рационе, но и другие внешние и внутренние факторы. Существуют данные, что кинурениновый путь метаболизма L-триптофана, ведущий к образованию никотинамида, активируется при холодовом стрессе, причем авторы выдвигают гипотезу о том, что в данном случае подобные изменения вызваны возрастающими потребностями организма в НАД⁺ [282].

1.9 - Некоторые производные L-триптофана с антиокислительными и седативными свойствами

В настоящее время общепризнано, что наряду с широко известными ферментными антиокислительными системами организма, антиоксидантные свойства могут проявлять разнообразные конечные и промежуточные продукты обмена веществ. Например, доказано антиоксидантное действие таких веществ, как мочева кислота, билирубин, гомованилиновая кислота и многих других. Зачастую, механизм антиоксидантного действия подобных «вспомогательных» антиоксидантов связан со свойствами ферментов, участвующих в их метаболических превращениях, но некоторые из этих метаболитов (включая и некоторые производные L-триптофана), могут сами обладать антиокислительной активностью.

В литературе отмечено антиоксидантное действие продукта окисления L-триптофана – 5-гидрокситриптофана [234]. Также отмечено, что триптофан-2,3-диоксигеназа (КФ1.13.11.11), участвует в первом этапе метаболизма L-триптофана по кинурениновому пути (рисунок 1), для разрыва пирольного кольца L-триптофана, использует супероксид-анион в качестве кофактора и субстрата, благодаря чему действует в качестве фермента антиоксидантной системы [210]. В этом же исследовании авторы показали, что 5-гидрокси-L-триптофан, 3-гидроксикинуренин, ксантуреновая кислота и 5-гидроксиантраниловая кислота действуют, как достаточно сильные антиоксиданты, ингибируя процессы ПОЛ в липосомах.

Эксперименты показывают, что мелатонин, продукт серотонинового пути метаболизма L-триптофана, является прямым перехватчиком гидроксильного и пероксильного радикалов, пероксинитрит-аниона и синглетного кислорода [294, 295]. Данная группа исследователей, в указанной работе, также выявила, что мелатонин стимулирует ряд антиоксидантных ферментов и обладает стабилизирующим действием на мембраны клеток. В отличие от большинства специфических антиоксидантов (витамин Е – действует только в богатой липидами среде), антиоксидантное действие мелатонина включает защиту липидов мембран, белков в цитозоле и ДНК в ядре. Более того, мелатонин

свободно проходит через все морфофизиологические барьеры и с легкостью проникает в любую клетку организма. Подобным, хотя и менее выраженным действием, обладает и серотонин, причем для него сохраняется тот же феномен универсальности приложения антиоксидантных эффектов [188, 193].

Влияние L-триптофана на функцию центральной нервной системы связано исключительно с серотониновым путем его метаболизма. Разнообразные метаболиты серотонинового пути оказывают седативное, антидепрессантное и снотворное действие на организм человека и животных.

Первые сведения о снотворном влиянии L-триптофана появились еще в начале 1970 годов [200, 239]. L-триптофан зарекомендовал себя, как эффективное и физиологичное снотворное средство [240]. Авторы приходят к заключению, что L-триптофан в качестве снотворного средства позволяет избежать неспецифических побочных эффектов других препаратов, подавляющих активность ЦНС, поскольку действие L-триптофана показано не только эмпирически, но и основано на физиологии и биохимии нормального сна: L-триптофан не нарушает структуру сна и ускоряет время засыпания [240].

Несколько позже, стало изучаться участие L-триптофана в профилактике развития аффективных расстройств, то есть депрессий, маний и биполярного расстройства. В частности, было выявлено, что маниакальные состояния связаны со снижением активности серотонина в центральной нервной системе [277]. Было показано, что L-триптофан как предшественник 5-гидрокситриптофана, является антидепрессантом, сравнимым по силе с трициклическими антидепрессантами (особенно в случаях преимущественно психомоторных проявлений) и потенцирует действие ингибиторов моноаминоксидазы [211]. В этой же работе были показаны «физиологические седативные» свойства L-триптофана, но клиническое применение данной аминокислоты, в качестве седативного средства, ставилась под сомнение, в связи с небольшой выраженностью данного действия.

Исследования на животных подтвердили снотворное действие L-триптофана на примере его аналога – 2-амино-3-(1-нафтил)-пропановой кислоты, а также доказали, что действие L-триптофана сопровождается

значительным снижением активности катехоламинов в головном мозге [221].

Однако, в то же время, стали появляться и данные о том, что L-триптофан действует достаточно избирательно, то есть оказывает свое влияние далеко не на все виды расстройств сна [267], а у пожилых пациентов его снотворное действие вообще ставилось под сомнение [268]. В то же время, у молодых больных с преимущественными расстройствами засыпания (но не собственно сна), эффективность и безопасность (включая отсутствие нарушений моторных, когнитивных расстройств и расстройств памяти) L-триптофана была подтверждена в крупных исследованиях [305].

Одновременно с этим продолжалось интенсивное изучение психотропного действия L-триптофана. Было показано, что монотерапия L-триптофаном эффективна при умеренных депрессивных расстройствах (с эндогенным компонентом) и резистентных формах биполярного расстройства, включая депрессивные расстройства у больных паркинсонизмом; потенцирующее действие при лечении L-триптофаном оказывают трициклические антидепрессанты (в связи с их серотонинергическим действием) [197].

Было проведено крупное многоцентровое исследование по антидепрессантному и снотворному действию L-триптофана в лечении тяжелых депрессивных расстройств в комбинации с флуоксетином [266]. Данные этого исследования свидетельствуют о том, что комбинация 2г L-триптофана с 200мг флуоксетина значительно раньше, чем при монотерапии флуоксетином, приводит к снижению симптомов депрессии, сохраняет физиологическую структуру сна (в отличие от монотерапии флуоксетином, при которой наступает резкое сокращение фазы медленного сна).

Таким образом, L-триптофан и его производные обладают как выраженными антиоксидантными, так и психотропными (седативными и снотворными) свойствами, что определяет широту их фармакологического применения.

ГЛАВА 2 - МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 - Общая характеристика лабораторных животных, использованных в исследованиях

Работа была проведена на 410 крысах-самцах линии Вистар зрелого (8–10 месяцев, массой 200–250г) и старого (19–22 месяца, массой 350–500г) возрастов. Взвешивание крыс производили на весах типа ВНЦ марки ВТЦ-10. Календарный возраст и масса тела экспериментальных крыс, соответствуют аналогичным показателям приводимых в работах ряда авторов [108, 269, 312]. Использование в эксперименте крыс с возрастом в 20 - 22 месяца в качестве старых, основывалось на рекомендациях Мещанинова В.Н. (1999) [108]. Автор считает, что исследование процессов старения необходимо сосредоточить в ходе их развития, когда имеется развернутая картина с выраженными процессами повреждения и адаптации, а также, когда существует достаточная уверенность в эффективности корректирующих воздействий. В противном случае, может быть затруднена интерпретация результатов по возрастным особенностям коррекции нарушенных процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), с выходом на обсуждение различий механизмов старения.

Зрелых и старых крыс, снабженных информацией о дате рождения и календарном возрасте, доставляли из питомников (НИИ геронтологии и гериатрии г.Москва и питомник "Рапполово" Ленинградской области). Эксперимент с крысами начинали проводить после двухнедельного карантина. Часть животных доставляли в виварий в зрелом возрасте и выдерживали до наступления старого возраста.

Крысы содержались в стандартных условиях лабораторного вивария, получали пищевой рацион в соответствии с приказом № 1179 от 10 октября 1983г, утвержденном МЗ СССР "Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения".

Для учета суточной и сезонной изменчивости исследуемых нами показателей, а также для снижения методической ошибки во всех проведенных нами исследованиях, наряду с опытными животными, в те же дни и часы в эксперименте использовали контрольных животных [300, 327, 330]. Все

исследования были выполнены в соответствии общепринятыми этическими нормами. Учтены «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом МЗ СССР № 755 от 12 августа 1977 года; «Европейская конвенция о защите животных, используемых для экспериментов или в иных целях», от 18 марта 1986 года; «Директива по охране животных, используемых в научных целях 2010/63/EU Европейского парламента и Совета» от 22 сентября 2010 года.

Для работы были использованы лабораторные реактивы марки ЧДА (чистый для анализа) или ХЧ (химически чистый) фирм: ООО «Сигма-Алдрич Рус» (Россия), ООО «Реапрепарат» (Россия), ОАО «ЛОМО» (Россия), «BIOLATEST - Erba Lachema s.r.o.» (Чехия).

2.2 - Проводимые на животных воздействия

В соответствии с задачами исследования экспериментальная часть была разделена на три части.

1. Изучение влияния иммобилизационного стресс-воздействия на изменения активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиокислительной активности (АОА) в системе крови зрелых и старых крыс (рисунок 2).

возраст крыс	контроль	иммобилизация		период после иммобилизации			
				 			
	время от начала эксперимента						
	0 часов	6 часов	12 часов	18 часов	24 часа	36 часов	108 часов
зрелые	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.
старые	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.	10 шт.

Рисунок 2 – Количество и группы крыс в экспериментальном моделировании стресс-реакции с помощью иммобилизационного воздействия.

Для достижения стресс-реакции использовалась иммобилизация животных [108, 168, 207, 285]. Иммобилизация животных проводилась с 8 часов утра до 8 часов вечера (12 часов) помещением крыс в тесные

пластиковые пеналы не позволяющие двигаться, но не стесняющие дыхание. Диаметр трубок для всех животных был одинаков (50мм), но длина трубки для каждого животного подбиралась индивидуально (старые животные, как правило, крупнее).

Для доказательства стресс реакции у крыс, подвергнутых иммобилизации проводилось морфологическое и биохимическое (измерение аскорбиновой кислоты) исследование надпочечников [38, 315] и измерение двигательной активности в тесте «открытое поле» [28].

2. Исследование действия нейромедиаторов вегетативной нервной системы (адреналин, ацетилхолин) на изменения процессов ПОЛ и АОА при иммобилизационном стресс-воздействии в системе крови крыс разного возраста (рисунок 3).

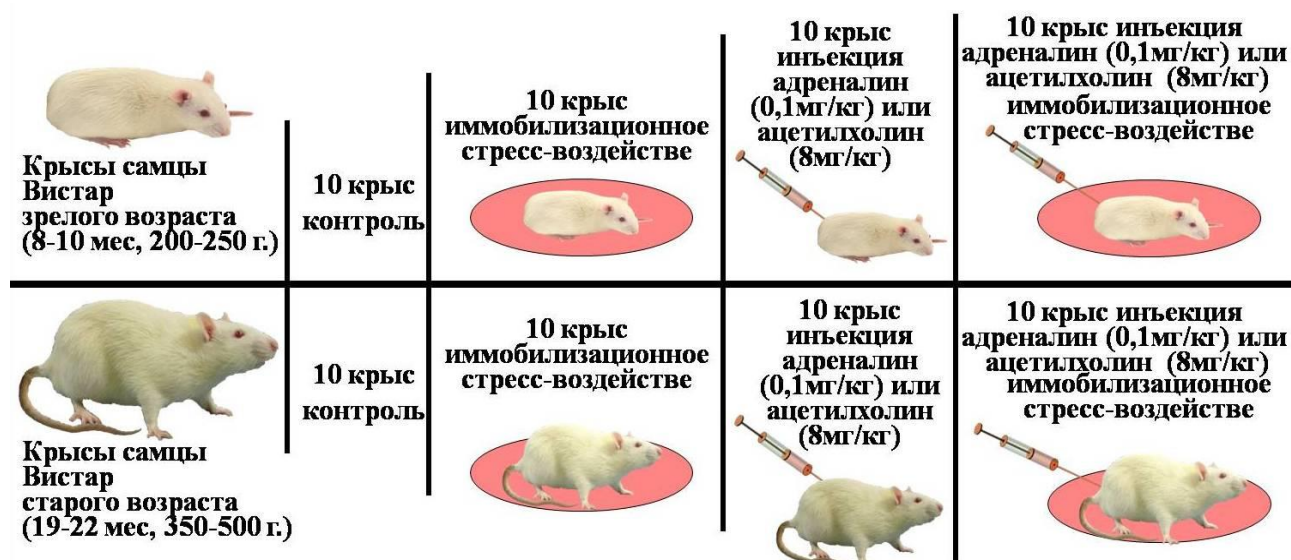


Рисунок 3 – Количество и группы крыс при исследовании влияния адреналина и ацетилхолина в условиях иммобилизационного стресс-воздействия

Инъекции нейромедиаторов в отдельности проводились в утреннее время, подкожно, в следующих дозировках:

1. ацетилхолина хлорида 1,25% раствора 8 мг/кг (производитель «Вектор ГНЦ вирусологии и биотехнологии», Россия).
2. адреналина гидрохлорида 1% раствора 0,1 мг/кг (производитель «Московский эндокринный завод», Россия).

Дозировки адреналина и ацетилхолина были выбраны в соответствии с рекомендациями других авторов [28, 156, 183, 223] .

3. Изучение влияния сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты

(Три + Н.к.) на изменения интенсивности процессов ПОЛ и АОА у крыс разного возраста при иммобилизационном стресс-воздействии (рисунок 4).

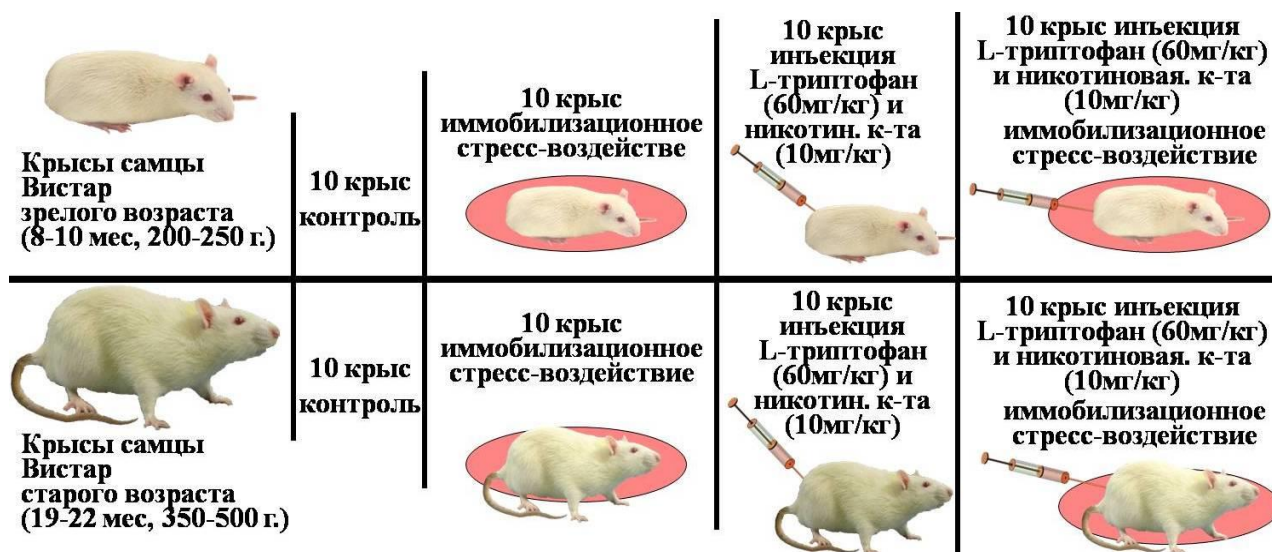


Рисунок 4 – Количество и группы крыс при исследовании действия сочетания «L-триптофан и никотиновая кислота» в условиях иммобилизационного стресс-воздействия

Инъекцию L-триптофана с никотиновой кислотой проводили подкожно в утреннее время контрольным и опытным крысам:

1. 1,3% раствор L-триптофана в дозировке 60 мг/кг;
2. 1% раствор никотиновой кислоты в дозировке 10 мг/кг.

Количество L-триптофана и никотиновой кислоты для инъекций были выбраны в соответствии с максимальной общепринятой суточной дозой этих веществ для человека. При расчете дозировки для крыс использовался коэффициент пересчета равноэффективных доз [28].

2.3 - Методика инкубирования миелокариоцитов с адреналином и ацетилхолином in vitro

В дополнение ко второму этапу эксперимента, были проведены опыты in vitro по инкубации миелокариоцитов интактных крыс с адреналином и ацетилхолином. После выделения миелокариоцитов, их количество подсчитывали с помощью камеры Горяева и довели концентрацию клеток до 4×10^7 клеток/мл средой Игла. Жизнеспособность клеток определяли по проценту окрашенных (0,4% раствором трипанового синего) в камере Горяева. Все манипуляции с клетками проводили на льду при температуре 4°C.

Адреналина гидрохлорид для эксперимента брали из запаянных ампул и

разводили средой Игла до концентрации $1,6 \times 10^8$ молекул/мл, из расчета 4 молекулы адреналина одну клетку. Дозировка была выбрана в соответствии с тем условием, что активация адренорецептора происходит только в результате его взаимодействия с четырьмя молекулами адреналина [13, 51, 297].

Ацетилхолина хлорид для эксперимента разводили средой Игла до концентрации 8×10^7 молекул/мл, из расчета две молекулы ацетилхолина на одну клетку. Данная дозировка была выбрана в соответствии с тем, что, активация ацетилхолинового рецептора происходит при его контакте с двумя молекулами ацетилхолина [35].

Для оценки уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) и биолюминесценции в миелокариocyтах *in vitro*, был применен хемилюминесцентный (ХЛ) анализ. Люминометр - фотометр Lucy 3 с двойным диспенсером и встроенным компьютером (Anthos Labtec Instruments (США) и хемилюминометр (1420.1, ТОО «Конструктор», Россия) был соединен с персональным компьютером с установленной на нем программой «Диагност», созданной указанной фирмой. Ход определения: 0,5-1 мл исследуемого материала вносили в термостатируемую затемненную кюветную камеру люминометра, снабженную мешалкой для перемешивания пробы; прогревали в течение 5 минут до температуры 37°C ; записывали фоновое значение свечения после открытия шторки прибора, разделяющей кювету и ФЭУ. Затем в пробу вводили 0,5 мл 3 % перекиси водорода для стимуляции ПОЛ в стандартных условиях. Вспышку ХЛ и дальнейшую ее динамику регистрировали в течение 90-180 секунд в виде кривой, отражающей зависимость интенсивности ХЛ от времени. По окончании заданного времени регистрации компьютерная программа «Диагност» рассчитывала в относительных единицах амплитуду и светосумму ХЛ. Амплитуда (h) ХЛ отражает в основном содержание в пробе легкодоступных для окисления соединений, светосумма (SS) ХЛ – соотношение в пробе про- и антиоксидантов.

Эксперименты по изучению миелокариocyтов *in vitro* были разделены на два этапа. На первом этапе изучалась динамика ПОЛ в миелокариocyтах при инкубации с адреналином или ацетилхолином. Отмытые и разведенные

миелокариоциты от каждой интактной крысы разделяли на 12 проб, по 0,5 мл каждой пробе. Измерение ХЛ проводили после добавления в пробу адреналина с последующим индуцированием перекисью водорода на 5с, 10с, 20с и т.д. Общее время инкубации 2 часа.

На втором этапе изучали биолуминесценцию миелокариоцитов после добавления адреналина или ацетилхолина, но уже без индуцирования перекисью водорода. Миелокариоциты от каждой интактной крысы разделялись на 6 проб по 1 мл в пробе. Адреналин или ацетилхолин добавляли в пробу на 5с инкубации. Каждое измерение проводилось в течение 90с. Контроль проводился двух типов. В первом контроле вместо адреналина использовалась среда Игла. Во втором контроле вместо миелокариоцитов использовалась среда Игла.

2.4 - Получение периферической крови, миелокариоцитов и гомогенатов органов крыс

Забой животных осуществляли в утренние часы, путем декапитации с применением эфирного рауш-наркоза, в каждом забое совместно с опытными животными забивали контрольных. Периферическую кровь, полученную при декапитации, собирали в охлажденные на льду чашки Петри, смоченные для предотвращения свертывания крови раствором гепарина (10000 ЕД в 1 мл раствора) и в сухие пробирки для получения сыворотки крови.

Костный мозг извлекали из бедренных костей, которые разрезали с 2-х сторон – между диафизом и эпифизом. Все манипуляции производили при температуре 0 – +4 градуса С°. Костный мозг после взвешивания на торсионных весах суспендировали в 10-кратном объеме физиологического раствора и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут на центрифуге ОПн-8. В результате центрифугирования происходило разделение содержимого пробирки на 4 части (сверху вниз): жировые клетки, супернатант, миелокариоциты, примесь эритроцитов периферической крови. Миелокариоциты отделяли от других фракций и разводили до стандартных значений содержания клеток в забуференном физиологическом растворе. Высокая антиокислительная активность (АОА) и низкая скорость накопления

продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в костном мозге и миелокариocyтах давали возможность довольно длительного манипулирования при подготовке органа к исследованию на льду, без существенного искажения фоновых значений исследуемых показателей ПОЛ и АОА. Супернатант также извлекался и дополнительно центрифугировался при 3000 об/мин в течение 10 минут, полученный вторичный супернатант извлекался и в дальнейшем использовался в эксперименте, как межклеточная среда костного мозга.

Печень и головной мозг крыс перфузировали холодным физиологическим раствором с целью удаления из сосудов органов периферической крови. Затем из организма крыс извлекали одну из долек печени и головного мозга, и далее пропускали их через охлажденный пресс с диаметром отверстий 0,7 мм. Полученную тканевую субстанцию взвешивали на весах и суспендировали в буферном физиологическом растворе в соотношении 1 г сырой массы органа на 5 мл раствора. Гомогенизацию образцов органов с целью разрушения клеток производили в гомогенизаторе Поттера-Эльвегейма (стекло-тефлон), с электроприводом при 3000 об./мин. и температуре от 0 до + 4 С°, в течение 2 минут. Полученный гомогенат фильтровали через капроновую ткань и до исследования хранили обложенные льдом при температуре от 0 до + 4 С°.

2.5 - Оценка состояния перекисного окисления липидов в органах и периферической крови у крыс

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по нескольким методам, отражающим различные стадии этого процесса. **Исследование хемилюминесценции (ХЛ)** проводили на приборе люминометре 1420.1 с фотоэлектронным умножителем (ФЭУ) 140 («Конструктор», Россия) и люминометром - фотометром Lucy 3 с двойным диспенсером («Anthos Labtec Instruments», США). Результаты исследования получали в виде графика зависимости интенсивности свечения от времени, учитывали показатели светосуммы и амплитуды ХЛ. В качестве источника стандартного свечения для тестирования ФЭУ использовали светодиод, дающий сверхслабое излучение в области 400–600 нм. Исследование ХЛ проводили на основе методических рекомендаций нескольких групп авторов [25, 44, 212].

Определение диеновой конъюгации высших ненасыщенных жирных кислот проводили в модификации по методу Стальной И.Д. (1977) [152], Кагана В.Е. (1986) [57]. Принцип метода состоит в спектрофотометрической регистрации характерного для продуктов ПОЛ максимума поглощения, при длине волны 232 нм (система сопряженных двойных связей в ненасыщенных жирных кислотах – диеновая конъюгация). Измерения проводили на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО) в ультрафиолетовой части спектра, при длинах волн 215 нм (общие липиды) и 232 нм (диеновая конъюгация) против контрольного раствора гептана. Результаты исследования диеновых конъюгатов выражали в молях на грамм (фосфолипидов, общего белка и липидов).

Определение уровня ПОЛ по накоплению малонового диальдегида (МДА) проводили на основе общепринятых методов [57, 153] в модификации, которая заключалась в инкубации гомогената органа в стандартных условиях для индукции ПОЛ. Такой вариант постановки метода дает информацию о соотношении в пробе ПОЛ и АОА. Расчет результатов производили в наномолях МДА на миллион клеток, грамм фосфолипидов, общего белка или липидов.

Для определения содержания гидроперекисей (ГП) липидов в крови и гомогенатах тканей была использована методика Романовой Л.А. и Стальной И.Д. [142]. Принцип метода: в разбавленных водных растворах гидроперекиси липидов окисляют Fe^{2+} до Fe^{3+} . Последний может быть обнаружен с помощью цветной реакции с тиоцианатом аммония при максимуме поглощения 480 нм.

2.6 - Оценка состояния антиокислительной активности в органах и периферической крови у крыс

Активность пероксидазы (КФ 1.11.1.7) определяли по методу Попова Т. с соавт. (1971) [70]. Метод основан на регистрации снижения концентрации индигокармина, который окисляется перекисью водорода в присутствии пероксидазы. Пробы спектрофотометрировали при длине волны 610 нм против дистиллированной воды. Активность фермента рассчитывали в каталах на 1г белка (для органов) или 1г гемоглобина (для периферической крови).

Для определения активность каталазы (КФ 1.11.1.6) был использован фотоколориметрический метод разработанный Королюк М.А. с соавт. (1988) [76]. Принцип метода основан на способности перекиси водорода, образовывать с солями молибдена стойкий комплекс желтого цвета. Измерения проводились на фотоколориметре ФЭК Н-57 при длине волны 400 нм. Активность фермента рассчитывали в каталах на 1г белка или гемоглобина.

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) (КФ 1.15.1.1.) проводили методом, предложенным В.А. Костюком (1990) [78]. Метод основан на способности СОД, тормозить реакцию автоокисления кверцетина при рН 10 в присутствии тетраметилэтилендиамина. Измерение активности СОД проводили спектрофотометрически, при длине волны 406 нм, путем записи кинетической кривой, отражающей реакцию ингибирования окисления кверцетина. Активность СОД выражали в мкмоль/мин.мг Нв (или белка тканей).

Активность глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) определяли спектрофотометрически, по скорости образования окисленного глутатиона при помощи сопряженной реакции с НАДФН-зависимым ферментом глутатионредуктазой. Регистрация изменений оптической плотности, при окислении НАДФН, проводилась на спектрофотометре СФ-46 (340 нм.) в течение 1 мин. [61]. Активность фермента выражали в мккат/мг белка ткани или сыворотки крови.

Определение общей неферментативной антиокислительной активности тканей или крови проводили по измерению величины торможения перекисного окисления липидов в модельной системе, где в качестве субстрата окисления использовали суспензию липопротеидов желтка куриных яиц [48, 66]. Для приготовления модельной системы, из куриного яйца выделяли желток, подсушивали его на фильтровальной бумаге, а затем смешивали с равным объемом фосфатного буфера (40 мМ KH_2PO_4 + 105 мМ KCl , рН 7,5). Полученную суспензию перед использованием разводили в 25 раз тем же буфером. Скорость перекисного окисления липидов определяли по количеству накопившегося МДА. Антиоксидантную активность рассчитывали по формуле:

$$AOA(\%) = (E_{\text{контр.}} - E_{\text{обр.}} / E_{\text{контр.}}) \times 100 \quad 7)$$

где *АОА* - антиоксидантная активность тканей или сыворотки крови в (%);
E контр. и *E обр.* - оптическая плотность, измеренная в образцах и контроле.

Для количественного определения церулоплазмينا использовалась его реакция со свежеприготовленным о-фенилдиамином, она останавливалась добавлением 96% серной кислоты. Далее, проводилось измерение оптической плотности реакционной смеси на длине волны 492 нм против раствора сравнения; концентрация определялась по калибровочному графику [59, 149].

Исследования перекисной резистентности эритроцитов проводили по методу Покровского А.А. с соавт. (1964). Метод основан на учете степени гемолиза эритроцитов периферической крови в присутствии перекиси водорода. Степень гемолиза эритроцитов определяли с помощью фотометрирования в супернатанте после центрифугирования проб. Перекисную резистентность эритроцитов оценивали в процентах как величину, обратную степени гемолиза эритроцитов.

Учитывая трудность однозначной трактовки состояния ПОЛ и АОА по отдельным показателям, был использован математический подход по обобщению полученных результатов, основанный на применении коэффициента антиокислительной защиты (КАОЗ) предложенный Нагорневым С.Н. (1995) [115]. В результате модификации КАОЗ были выведены формулы коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) и коэффициента антиокислительной активности (КАОА). КПОЛ и КАОА рассчитывались отдельно для каждой крысы и были использованы в дальнейшем анализе данных диссертационной работы.

$$КПОЛ = \frac{100 \times \sum_{n=4}^1 \left[\frac{N_1}{N_{1 \text{ ср.зн.}}} + \frac{N_2}{N_{2 \text{ ср.зн.}}} \dots + \frac{N_n}{N_{n \text{ ср.зн.}}} \right]}{n} \quad 8)$$

N – показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ):

1. хемилюминесцентный анализ (ХЛ),
2. диеновые конъюгаты (ДК),
3. малоновый диальдегид (МДА),
4. гидроперекиси (ГП).

Nср.зн – средние значения показателей ПОЛ у интактной группы крыс

n – количество показателей

$$KAOA = \frac{100 \times \sum_{n \rightarrow 7}^1 \left[\frac{N_1}{N_{1 \text{ ср.зн.}}} + \frac{N_2}{N_{2 \text{ ср.зн.}}} \dots + \frac{N_n}{N_{n \text{ ср.зн.}}} \right]}{n} \quad 9)$$

N - показатели антиокислительной активности (АОА):

1. пероксидаза (КФ 1.11.1.7),
2. каталаза (КФ 1.11.1.6),
3. супероксиддисмутаза (СОД) (КФ 1.15.1.1),
4. глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.9),
5. общая антиокислительная активность,
6. перекисная резистентность эритроцитов,
7. церулоплазмин,

N_{ср.зн} – средние значения показателей ПОЛ у интактной группы крыс

n – количество показателей

2.7 - Оценка липидного и липопротеидного состава крови и органов у крыс

Триглицериды. Определение триглицеридов проводилось унифицированным методом, по реакции с ацетилацетоном после экстракции смесью гептана и изопропилового спирта [105]. Принцип метода: триглицериды экстрагируются смесью гептана и изопропилового спирта, в которую переходят только неполярные липиды, а полярные фосфолипиды остаются в водной фазе. Триглицериды омыляются (гидролизуются) щелочью, глицерин окисляется йодной кислотой до формальдегида, который определяется по цветной реакции с ацетилацетоном.

Холестерин. Определение холестерина проводилось унифицированным методом, по реакции с хлорным железом (метод Златкис-Зака) [105]. Принцип метода: содержащийся в плазме или сыворотке крови свободный и эфирно-связанный холестерин окисляется хлорным железом в присутствии уксусной, серной и фосфорной кислот с образованием ненасыщенных продуктов, окрашенных в красно-фиолетовый цвет. Фосфорная кислота повышает стойкость реактива, содержащего хлорное железо.

Фосфолипиды. Для определения концентрации фосфолипидов был использован метод, описанный у Камышникова В.С. (2000) [59]. Метод основан на определении концентрации органического фосфата, освобождающегося при

кислотном гидролизе фосфолипидов экстрагированных из пробы. Измерение содержания неорганического фосфата проводилось реакцией с молибдатом аммония.

Фракции липопroteидов очень низкой, низкой и высокой плотности (ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП) определялись иммуноферментным методом в соответствии с методикой, описанной в [9].

Липопroteидный коэффициент (ЛК) рассчитывали по формуле:

$$\text{ЛК} = (\text{ЛПОНП} + \text{ЛПНП}) / \text{ЛПВП} \quad 10)$$

2.8 - Морфологическое исследование периферической крови и надпочечников крыс

Количество эритроцитов и миелокариоцитов подсчитывали с помощью камеры Горяева. Содержание гемоглобина определяли гемоглобинцианидным методом с помощью стандартных наборов (НПО «Биохимреактив»). Количество ретикулоцитов подсчитывали в мазках периферической крови, окрашенных бриллиант-крезиловой синью, при увеличении микроскопа 10х90х1,5 с иммерсионным объективом [77]. Извлеченные надпочечники обезвоживали жидкостью Карнуа и Ценкера и затем заливали в парафин по общепринятой методике [106]. С помощью микротомы модели 1165 (Rotocut Reichert Jung) получали срезы толщиной 5–6 мкм и после депарафинации окрашивали их гематоксилином и эозином [106].

2.9 - Некоторые вспомогательные лабораторные методы исследования

Для оценки активности фосфолипазы А2 (КФ 3.1.1.4) использовался метод Тужилина С.А. (1975), основанный на определении количества ненасыщенных кислот, образовавшихся в результате гидролиза лецитина (в качестве субстрата применялась эмульсия яичного желтка) [166].

Содержание общего белка в сыворотке крови и в гомогенатах органов животных определяли биуретовым методом с помощью стандартных наборов реактивов (Реапрепарат «ДИА-М», Москва). Перед определением белка, из гомогенатов органов экстрагировали мешающие определению липиды и пигменты, подогретой (до 50 С°) смесью этилового спирта с диэтиловым

эфиром (4 : 1) [59, 105].

Содержание аскорбиновой кислоты в гомогенате надпочечников определяли по методу, основанному на способности аскорбиновой кислоты восстанавливать 2,6-дихлорфенолилиндофенол [59, 77].

2.10 - Методы статистической обработки результатов исследования

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Excel для Windows XP. Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием параметрических и непараметрических критериев статистики. Для оценки количественных показателей в случае нормального распределения выборки (распределения Гаусса) использовался параметрический t-критерий Стьюдента. Для описания различий между двумя независимыми выборками, выходящими за нормальное распределение, использовался непараметрический U-критерий Манна–Уитни, позволяющий выявлять различия между малыми выборками. Для выявления взаимосвязей между рядом показателей был использован корреляционный анализ с линейным коэффициентом корреляции Пирсона. Все данные были приведены как среднее арифметическое, стандартное отклонение и ошибка среднего с 95% доверительным интервалом (статистически достоверные различия принимали при $p < 0,05$). В экспериментальных исследованиях сравнение проводили между опытными и контрольными группами зрелых и старых животных [79].

ГЛАВА 3 - ИЗМЕНЕНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ У КРЫС ЗРЕЛОГО И СТАРОГО ВОЗРАСТА ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕСС-ВОЗДЕЙСТВИИ

Работы последних десятилетий показали важное участие процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиокислительной активности (АОА) в механизмах реализации стресс-реакции на различные экстремальные воздействия [36, 37, 95, 108]. Увеличение уровня перекисного окисления служит одним из показательных маркеров и компонентов развития стресс-реакции [127, 180, 185]. В свою очередь, активация ПОЛ приводит к ответному увеличению активности антиокислительной системы, что играет важную роль в реализации адаптации к стрессу [25, 69, 101, 174]. Процессы перекисного окисления и состояние антиокислительной активности в настоящее время считаются одним из важных механизмов регуляции психофизиологических реакций при стрессе [15, 225, 276].

В современной литературе присутствуют описания экспериментального моделирования стресс-воздействия и большинство из них связано с изоляцией или высокой физической нагрузкой [154, 174, 229, 286]. Не менее адекватной моделью стресс-воздействия является гиподинамический стресс или иммобилизация. [28, 182]. При использовании иммобилизации возникают типичные для стресса изменения в системе крови, надпочечниках и ЦНС [27, 214, 326]. Воздействие иммобилизации, как психосоматического стресс-воздействия, увеличивает выход катехоламинов, вызывающих активацию ПОЛ в организме [121, 173, 232, 319].

Простота в работе с моделью иммобилизации, ее дешевизна, доступность и отсутствие повреждающих факторов для исследуемых объектов сделали эту модель приоритетной и целесообразной для проведения данной работы.

Иммобилизационное воздействие, как и любое другое экстремальное стресс-воздействие, может приводить к активации свободно-радикальных процессов в организме зрелых и старых животных. При этом в организме старых животных происходит утилизация продуктов ПОЛ, сопровождающаяся

образованием Шиффовых оснований, что приводит к модификации внутриклеточных макромолекул и облегчает повреждение клеток. Напротив, в тканях животных зрелого возраста утилизация продуктов ПОЛ не приводит к накоплению Шиффовых оснований, что уменьшает стрессовые повреждения [159, 228, 331].

Таким образом, представляется актуальным оценить изменения, происходящие с процессами ПОЛ и АОО в системе крови крыс, как в процессе иммобилизационного стресс-воздействия, так и после окончания данного воздействия, а также сравнить динамику процессов ПОЛ и АОО в системе крови при иммобилизационном стресс-воздействии между группами животных зрелого и старого возраста.

3.1 - Состояние процессов перекисного окисления липидов и антиокислительной активности периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Данные литературы относительно изменений в системе крови при действии стресса отличаются противоречивостью. С одной стороны, высказывается мнение о том, что система крови, подвергаясь старению, теряет резервы адаптации необходимые для адекватного ответа на стресс [95, 108, 180, 185]. Однако при этом в некоторых исследованиях не выявлено никаких достоверных изменений в системе гемопоза в стрессовых ситуациях с возрастом [69, 141, 189, 216]. Существующие противоречия исследователи связывают как с выраженной неоднородностью исследуемых групп, так и с отсутствием в литературе стандартизованных протоколов для проведения сравнительных исследований такого рода.

Динамика ПОЛ крови в ходе развития стресс-реакции имеет фазный характер [40], эти фазные изменения обратно-пропорциональный к стадиям стресса (тревога (шок, противошок), резистентность, истощение) [147] (рисунок 5, 6). Это указывает на то, что уровень активности ПОЛ в организме является одним из критериев развития стресс-реакции, причем по величине ПОЛ, можно установить в какой стадии стресс-реакции находится организм (рисунок 6).

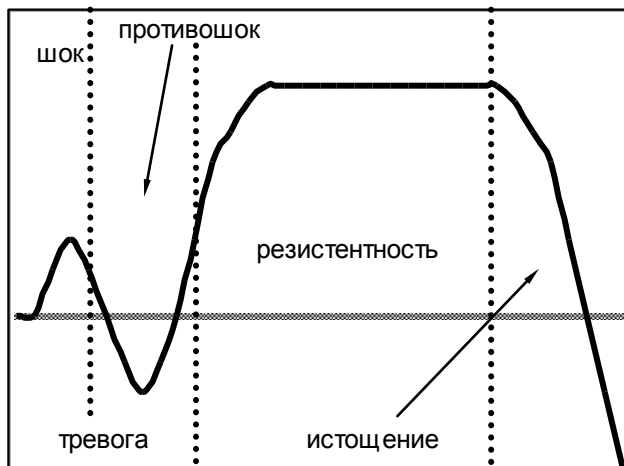


Рисунок 5 – Динамика изменения резистентности к стрессу при развитии общего адаптационного синдрома (Селье Г., 1982) [147]

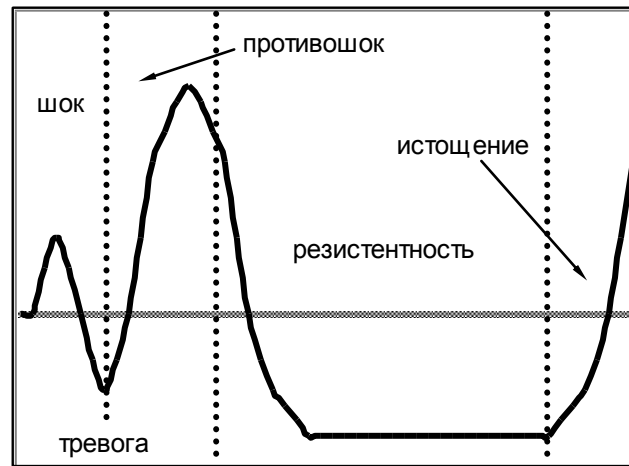


Рисунок 6 – Динамика перекисного окисления липидов в крови и головном мозге при развитии общего адаптационного синдрома (Гуляева Н.В., 1989) [40]

3.1.1 - Состояние процессов перекисного окисления липидов в периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Изучение перекисного окисления липидов (ПОЛ) в периферической крови (плазма, эритроциты) зрелых и старых интактных крыс не выявило достоверных возрастных различий, обнаружилась лишь тенденция к более высоким показателям коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) у зрелых крыс. При исследовании показателей ПОЛ периферической крови крыс на фоне иммобилизационного стресс-воздействия были получены данные, демонстрирующие фазное изменение показателей ПОЛ в соответствии со стадиями (тревога (шок, противошок), резистентность), (рисунок 7). В фазе шока (6 час эксперимента) у зрелых животных происходит повышение уровня ПОЛ на 13,2% ($p > 0,05$) и незначительное повышение у старых животных (таблица 1).

Эти изменения, во-первых, можно связать с ролью центральной нервной системы, контролирующей пусковые механизмы, активирующие процессы ПОЛ в начальных стадиях стресса при психо-эмоциональном напряжении. Экстремальное стресс-воздействие на организм животных сопровождается ответной реакцией в виде выброса в кровь катехоламина адреналина, который, по мнению некоторых ученых, способен активировать ПОЛ [40, 74]. Во-вторых, в данной ситуации происходит перестройка в работе биогенных

радикал-генерирующих систем с изменением кислородного метаболизма [49]. К этим системам относятся, цепи электронного транспорта в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме [37, 95], а также фагоцитирующие эффекторы воспаления [25].

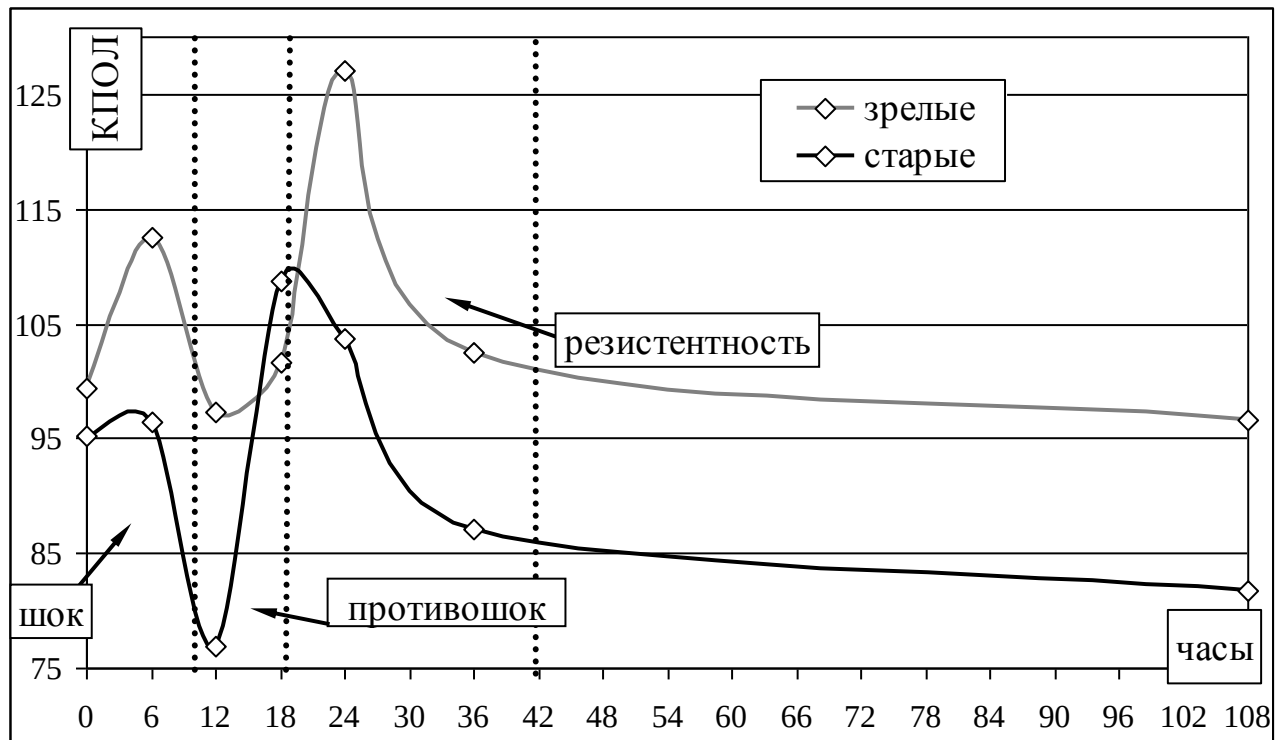


Рисунок 7 – Динамика коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) в периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Таблица 1 – Изменение коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ %) в периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

возраст крыс	контроль	иммобилизация		период после иммобилизации			
	0 часов	6 часов	12 часов	18 часов	24 часа	36 часов	108 часов
	время от начала эксперимента						
зрелые	99,5 ±9,0	112,6 ±10,6	97,3 ±16,7	101,7 ±5,4	127,0 ±11,2 **	102,6 ±10,1	96,6 ±13,6
старые	95,3 ±6,3	96,5 * ±2,3	76,9 ±20,3	108,7 ±6,2 **	103,7 * ±13,0	87,1 * ± 4,6 **	81,7 ± 4,8 **

Примечание: * $p < 0,05$ при сравнении двух возрастов;

** $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой (одного возраста).

В стадии тревоги (рисунок 7) активизируется срочная адаптация, у зрелых и старых крыс к 12 часу эксперимента происходит снижение уровня ПОЛ (таблица 1). У зрелых крыс коэффициент перекисного окисления липидов (КПОЛ) имел тенденцию к уменьшению, у старых крыс уменьшился на 19,3%

($p>0,05$), по сравнению с контролем. Полученное снижение коэффициента ПОЛ, можно связать с действием ферментативных и неферментативных антиоксидантов [22, 23, 27].

Таким образом, иммобилизационное стресс-воздействие повышает уровень ПОЛ в периферической крови зрелых и старых крыс. Изменение ПОЛ при стрессе у старых крыс происходит несколько раньше, чем у зрелых крыс, с опережением в несколько часов (рисунок 7).

3.1.2 - Состояние процессов антиокислительной активности в периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Величина коэффициента антиокислительной активности (КАОА) в крови старых интактных крыс был достоверно выше на 21,1% ($p<0,05$) по сравнению со зрелыми крысами. При изучении динамики КАОА в крови зрелых и старых

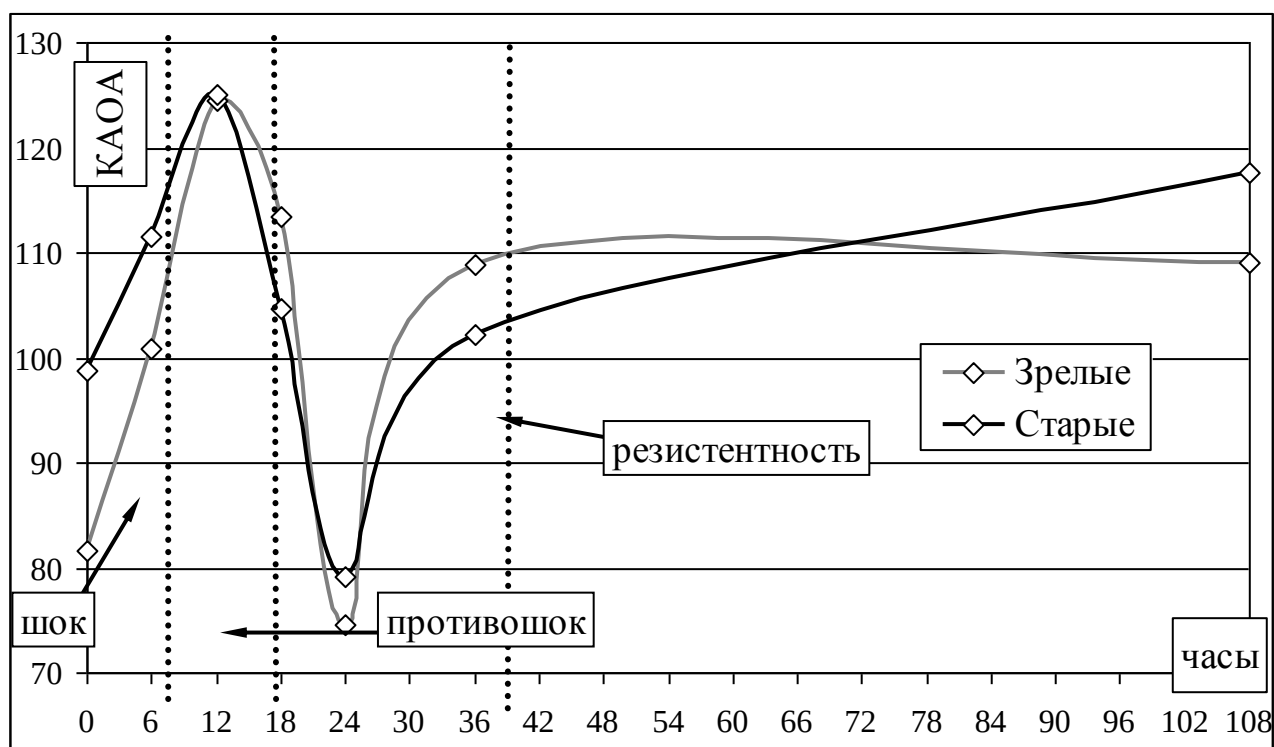


Рисунок 8 – Динамика коэффициента антиокислительной активности (КАОА) в периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

крыс на фоне иммобилизационного стресс-воздействия в стадии тревоги происходит ингибирование ПОЛ, при этом уровень АОА максимален (рисунок 8). В стадии тревоги (12 час эксперимента) у зрелых животных КАОА был

больше на 52,2% ($p < 0,05$), у старых животных - на 26,5% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (таблица 2).

Таблица 2 – Изменение величины коэффициента антиокислительной активности (КАОА %) в периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

возраст крыс	контроль	иммобилизация		период после иммобилизации			
	0 часов	6 часов	12 часов	18 часов	24 часа	36 часов	108 часов
	время от начала эксперимента						
зрелые	81,6 ± 10,7	100,9 ± 3,8**	124,4 ± 12,2**	113,4 ± 8,0**	74,5 ± 7,8	108,9 ± 2,3**	109,1 ± 4,8**
старые	98,8 * ± 2,3	111,6 * ± 5,2**	125,0 ± 12,7**	104,6 ± 15,0	79,1 ± 10,1**	102,1 ± 10,6	117,6 ± 16,6

*Примечание: * $p < 0,05$ при сравнении двух возрастов;*

*** $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой (одного возраста).*

Увеличение КАОА в фазу противошока связано с мобилизацией и выходом из различных депо неферментативных и ферментативных антиоксидантов. Известно, что активность каталазы в эритроцитах больше, чем в плазме крови [291]. При экстремальном воздействии фермент каталаза, находящийся в эритроцитах, выходит из мембраны и примембранного пространства цитоплазмы эритроцитов в плазму крови, увеличивая общую АОА [81]. Были получены данные подтверждающие этот факт, изменения ферментативного КАОА были обратно пропорциональны изменениям активности эритроцитарной каталазы (рисунок 9). То есть, при увеличении ферментативной АОА в плазме крови в стадию резистентности у животных происходило уменьшение каталазной активности в эритроцитах, что свидетельствует о миграции каталазы из примембранного пространства цитоплазмы эритроцитов в плазму крови. В стадию резистентности (18-30 часов) при развитии стресс-реакции на иммобилизационное воздействие у зрелых и особенно старых крыс запускались механизмы адаптации, связанные с активацией и выходом из депо антиоксидантов, в том числе и каталазы. Дальнейшее повышение активности каталазы эритроцитов у крыс на поздних этапах стресс-реакции (30-110 часов), можно связать с обратной миграцией фермента из плазмы крови в эритроциты.

В ходе стадии тревоги при стресс-реакции увеличивается уровень

витамина Е (выходит из жирового депо), холестерина и других природных метаболитов, выполняющих роль ловушек свободных радикалов [203, 301]. На этапе начального ингибирования ПОЛ при стрессе возрастает супероксидперехватывающая активность безбелкового экстракта сыворотки крови [40]. Супероксидперехватывающей способностью обладают находящиеся в сыворотке крови комплексы аминокислот с медью, жирорастворимые витамины А и Е, свободные тиоловые группы, мочевая кислота.

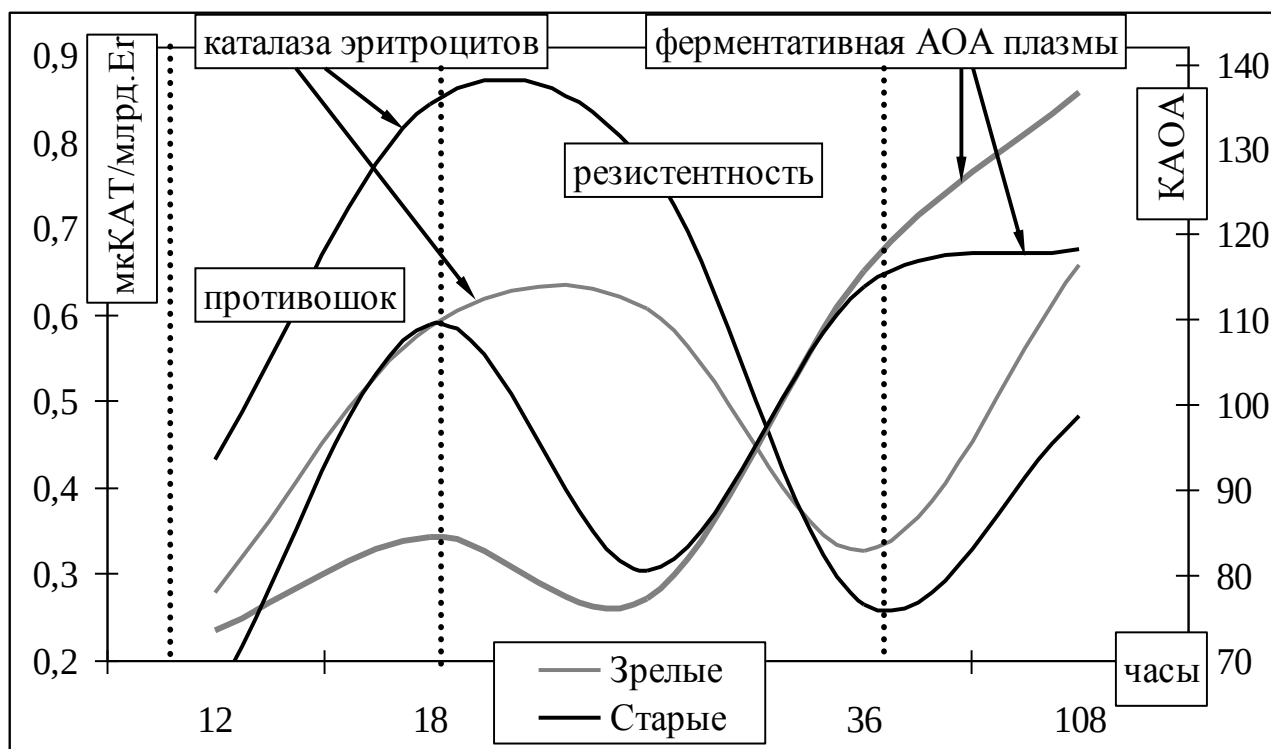


Рисунок 9 – Сравнительная динамика активности каталазы в эритроцитах и ферментативного коэффициента антиоксидантной активности (КАОА) в периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Так как неферментативные антиоксиданты большей частью не регенерировали в организме [21, 27, 38], то по мере их расходования на обезвреживание активных радикалов, начальное ингибирование ПОЛ в стадии тревоги сменялось активацией (рисунок 7). Через 6-12 часов после иммобилизационного стресс-воздействия (18-24 час эксперимента) активность ПОЛ у зрелых животных увеличивалась на 27,6% ($p < 0,05$), у старых животных – на 14,1% ($p < 0,05$), по сравнению с контролем одного возраста (таблица 1). При этом наблюдалось снижение неферментативной АОА (рисунок 10) и к 12 часам после иммобилизационного стресс-воздействия (24 час эксперимента), у

зрелых крыс неферментативная АОА снизилась на 57,7% ($p < 0,05$), у старых крыс - на 54,8% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (таблица 3).

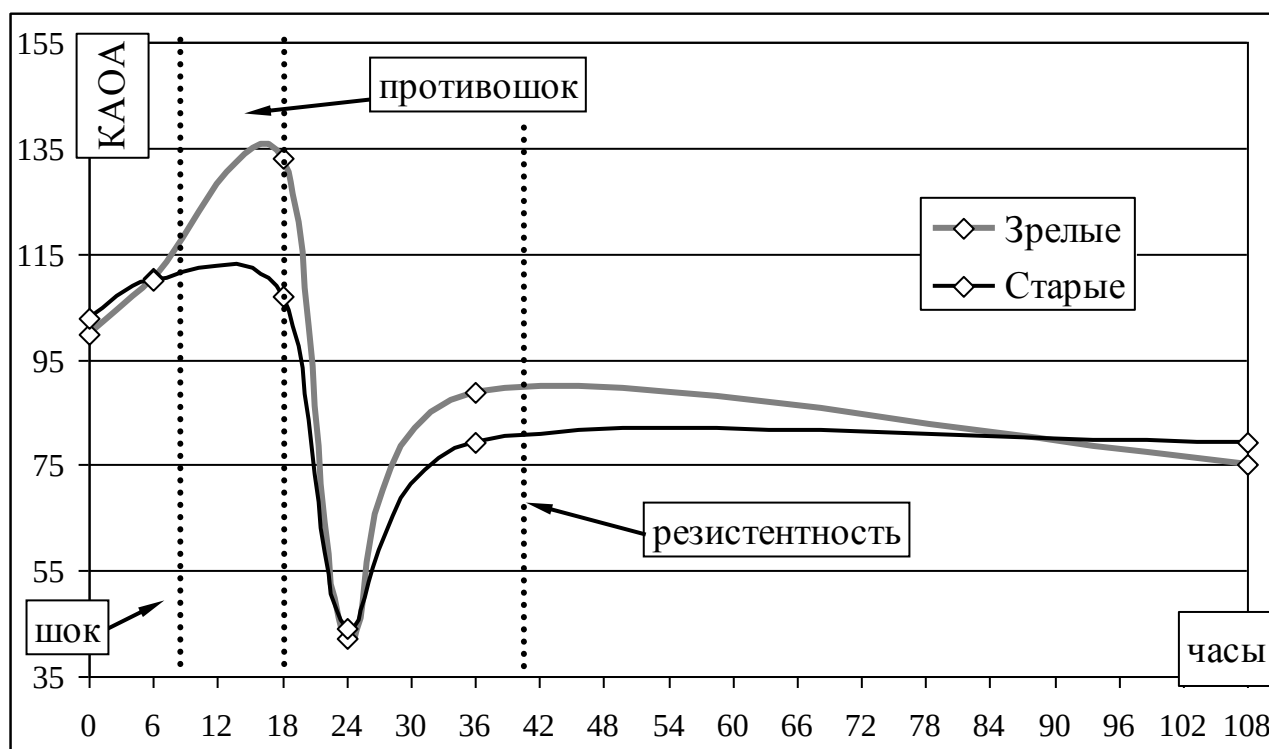


Рисунок 10 – Динамика неферментативного коэффициента антиокислительной активности (КАОА) в периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Нарушения микроциркуляции, наблюдаемые при стрессе, приводили к усиленному радикалообразованию и разрыхлению структуры мембран [22]. Кроме того, катехоламины с увеличением своей концентрации вместо антиокислительных свойств, приобретали прооксидантные свойства [4, 173]. При аутоокислении катехоламинов в фенольном кольце может образоваться эндоперекисная группировка, в результате чего они превращаются в генераторы свободных радикалов. Все перечисленные выше процессы создавали благоприятные условия для активации процессов ПОЛ в организме.

В период истощения резервов срочной адаптации (18-20 час эксперимента) на первый план выходили механизмы долговременной адаптации, и стадия тревоги переходила в стадию резистентности. С этого этапа уровень ПОЛ контролировался в основном синтезом ферментов с антиокислительными свойствами (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатионпероксидаза и т.д.). Благодаря этому происходило постепенное уменьшение уровня ПОЛ вплоть до нормализации и дальнейшего его

понижения (рисунок 7). Так через 4 суток после иммобилизации (108 час эксперимента) величина КПОЛ в периферической крови зрелых крыс уменьшилась на 2,9% ($p>0,05$), у старых крыс - на 14,3% ($p<0,05$), по сравнению с контролем каждого возраста (таблица 1).

Многие авторы связывают долговременную адаптацию с изменением ферментативного спектра и как следствие - биохимических процессов в клетке [99, 102]. Для осуществления такой перестройки клетке, в первую очередь, необходимо произвести изменения в работе генетического аппарата, а именно в контроле над синтезом специфических белков. Так по данным Меерсона Ф.З. с соавторами (1987) [103], спустя 24 часа после 6 часов иммобилизации с проявлениями стресс-реакции, уровень синтеза РНК и РНК-полимераз (печень, сердце, селезенка) достигает максимальных значений по сравнению с нормой (рисунок 11) [103], что доказывает увеличение синтеза белка при включении механизмов долгосрочной адаптации.

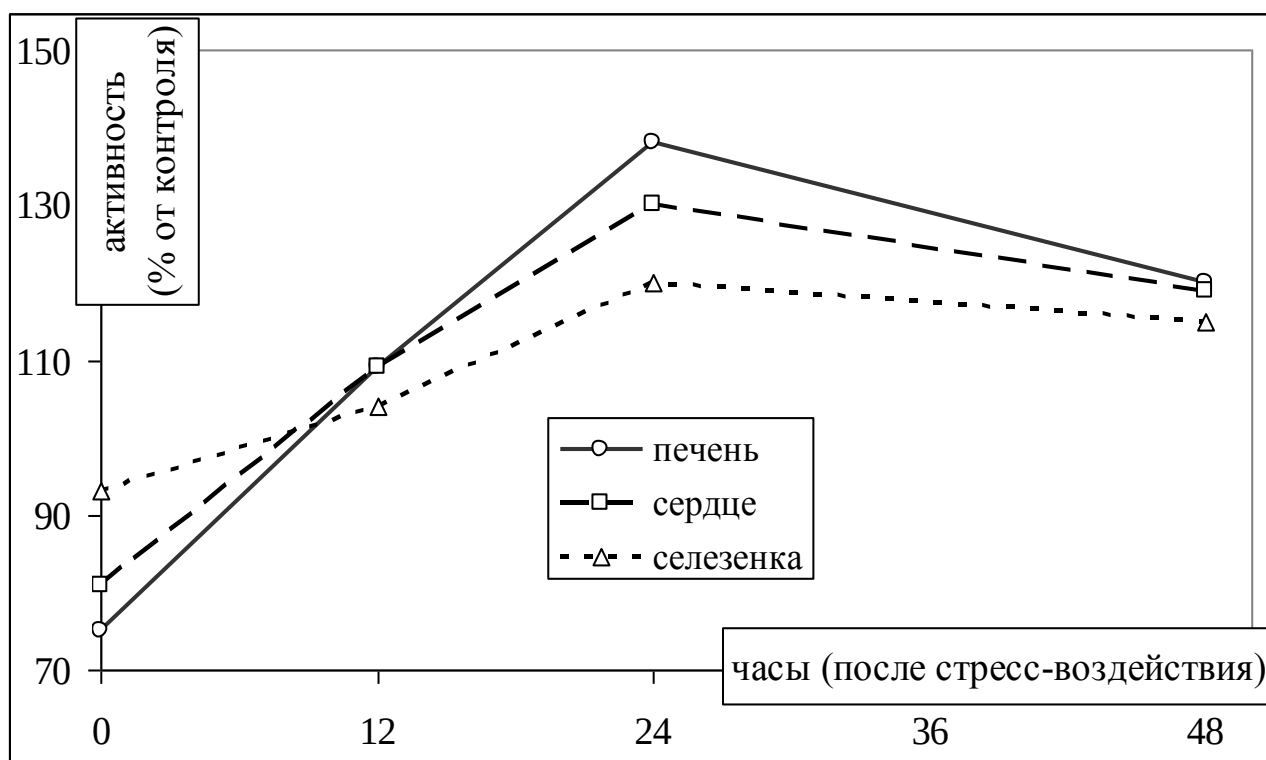


Рисунок 11 – Изменение активности РНК-полимеразы при действии иммобилизационного стресса (по данным Явич М.П., Меерсона Ф.З., 1987) [103]

Таким образом, при иммобилизационном стресс-воздействии процессы ПОЛ и АОА участвовали в развитии стресс-реакции с проявлением срочной и долговременной адаптации организма. При этом динамика изменения ПОЛ и АОА на фоне развития общего адаптационного синдрома позволила выделить

все стадии стресс-реакции, описанные Г. Селье (1979) (тревога (шок, противошок), резистентность, истощение) [147].

3.2 - Состояние процессов перекисного окисления липидов и антиокислительной активности в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Костный мозг активно реагирует на любые экстремальные воздействия, в том числе и на иммобилизационное стресс-воздействие [38]. При этом в миелокариоцитах костного мозга происходят изменения в активности процессов перекисного окисления липидов и антиокислительной активности (ПОЛ/АОА) и одновременно с этим происходят изменения в активности пролиферации. Процессы ПОЛ, могут быть одними из контролирующих или пусковых механизмов деления клеток красного костного мозга [108].

3.2.1 - Состояние процессов перекисного окисления липидов в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Изучение перекисного окисления липидов (ПОЛ) в миелокариоцитах зрелых и старых интактных крыс не выявило достоверных возрастных различий. При иммобилизационном стресс-воздействии в фазе шока (6 час эксперимента) величина коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) в миелокариоцитах у крыс обоих возрастов достигала максимума (рисунок 12), у зрелых животных уровень ПОЛ увеличивался на 107,8% ($p < 0,05$), у старых животных - на 73,0% ($p < 0,05$), по сравнению с интактными (таблица 4).

Активность ПОЛ при стресс-воздействии на отдаленных сроках эксперимента (108 час эксперимента) не возвращалась к норме. Уровень КПОЛ в миелокариоцитах на 108 часу эксперимента был меньше на 51,5% ($p < 0,05$), у старых – на 24,3% ($p > 0,05$), по сравнению с контрольной группой. Кроме того, у зрелых крыс проявлялась тенденция к дальнейшему снижению КПОЛ в миелокариоцитах (рисунок 12). Возможно, это связано с активацией АОА, а именно с увеличением количества антиокислительных ферментов (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и редуктаза).

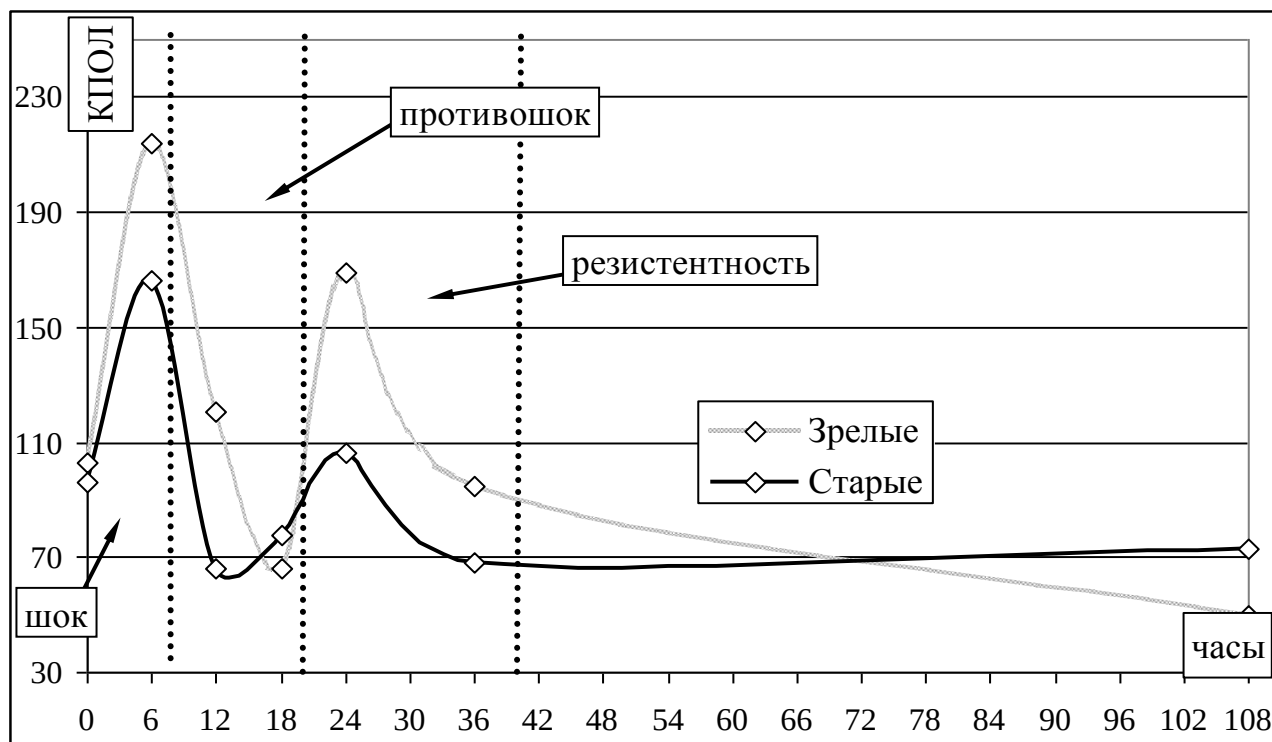


Рисунок 12 – Динамика коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) в миелокариocyтах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

При сравнении графика изменения КПОЛ миелокариocyтов с графиком изменения КПОЛ периферической крови у крыс при иммобилизационном стресс-воздействии обнаружилось сходство в динамике этих процессов (рисунок 7, 12). Корреляционный анализ данных между КПОЛ крови и КПОЛ миелокариocyтов (коэффициент корреляции составил 0,61 $p < 0,05$) выявлял взаимосвязь между этими показателями, демонстрируя возможное участие миелокариocyтов в активации процессов ПОЛ в периферической крови крыс при иммобилизационном стресс-воздействии (рисунок 13).

Таблица 4 – Изменения величины коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ%) в миелокариocyтах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

возраст крыс	контроль	иммобилизация		период после иммобилизации			
	0 часов	6 часов	12 часов	18 часов	24 часа	36 часов	108 часов
	время от начала эксперимента						
зрелые	103,0 ± 24,5	214,1 ± 50,7**	120,9 ± 37,9	66,2 ± 6,9**	169,2 ± 39,8**	94,9 ± 28,2	49,9 ± 7,9**
старые	96,0 ± 17,0	166,0 ± 38,6**	66,3 ± 29,4	77,8 * ± 2,1**	106,0 * ± 24,6	68,3 ± 14,8	72,7 * ± 10,1

Примечание: * $p < 0,05$ при сравнении двух возрастов;

** $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой (одного возраста).

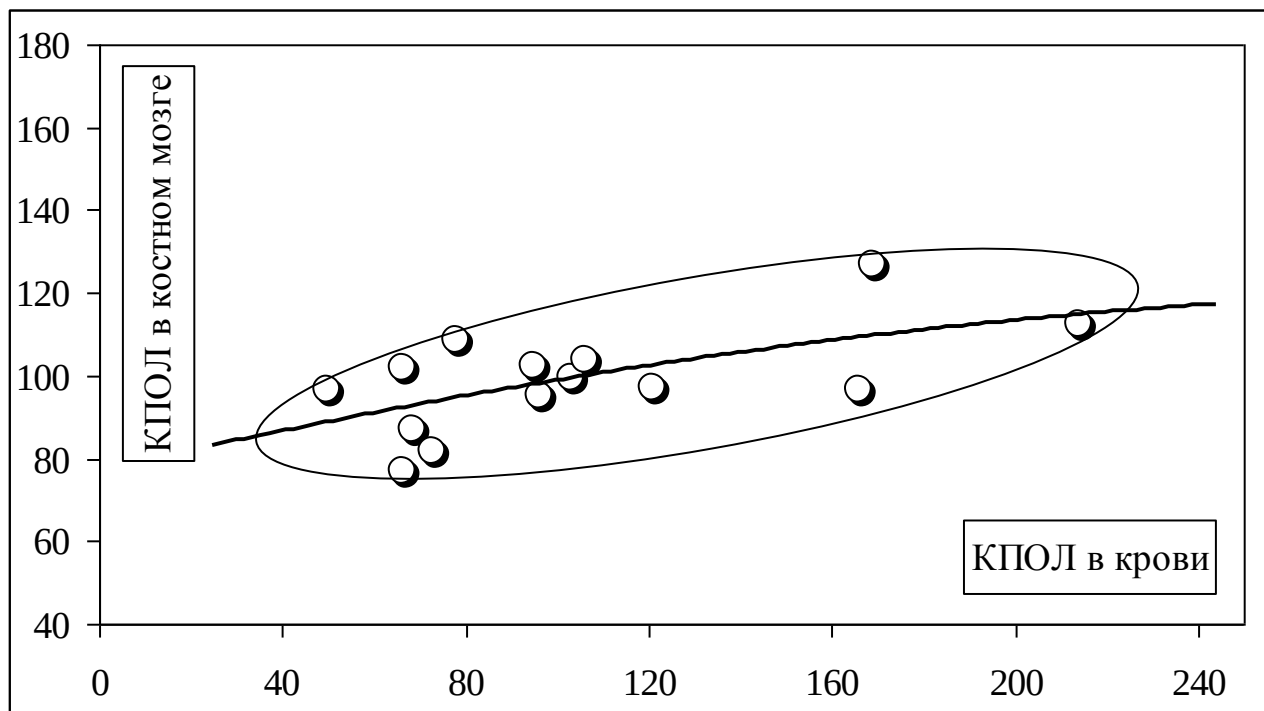


Рисунок 13 – Корреляционная зависимость между коэффициентом перекисного окисления липидов (КПОЛ) крови и миелокариоцитов у крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Исходя из анализа полученных данных, можно отметить, что миелокариоциты костного мозга реагировали на иммобилизационное стресс-воздействие аналогично периферической крови. При изучении процессов ПОЛ в миелокариоцитах на фоне иммобилизационного стресс-воздействия были получены данные, подтверждающие фазное изменение КПОЛ (рисунок 12). Это совпадает с представлениями о стадиях развития общего адаптационного синдрома (шок, противошок (тревога), резистентность, истощение) [147].

3.2.2 - Состояние процессов перекисного окисления липидов в межклеточной среде костного мозга у зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

У интактных зрелых и старых крыс в межклеточной жидкости костного мозга возрастных различий величины коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) обнаружено не было. Максимальное значение величины КПОЛ в межклеточной среде (МС) костного мозга зрелых и старых крыс наблюдалось в конце стадии тревоги и начале стадии резистентности (18-24 час эксперимента) (рисунок 14). У старых крыс (18 час эксперимента) уровень КПОЛ в МС костного мозга увеличился на 77,1% ($p < 0,05$), у зрелых крыс (24

час эксперимента) увеличился на 53,9% ($p < 0,05$), по сравнению с контролем (таблица 5). При изучении уровня КПОЛ в МС костного мозга зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии изменения величины КПОЛ происходили в соответствии со стадиями стресс-реакции (шок, противошок (тревога), резистентность) и были аналогичны изменениям величины КПОЛ в миелокариocyтах при тех же условиях (рисунок 12).

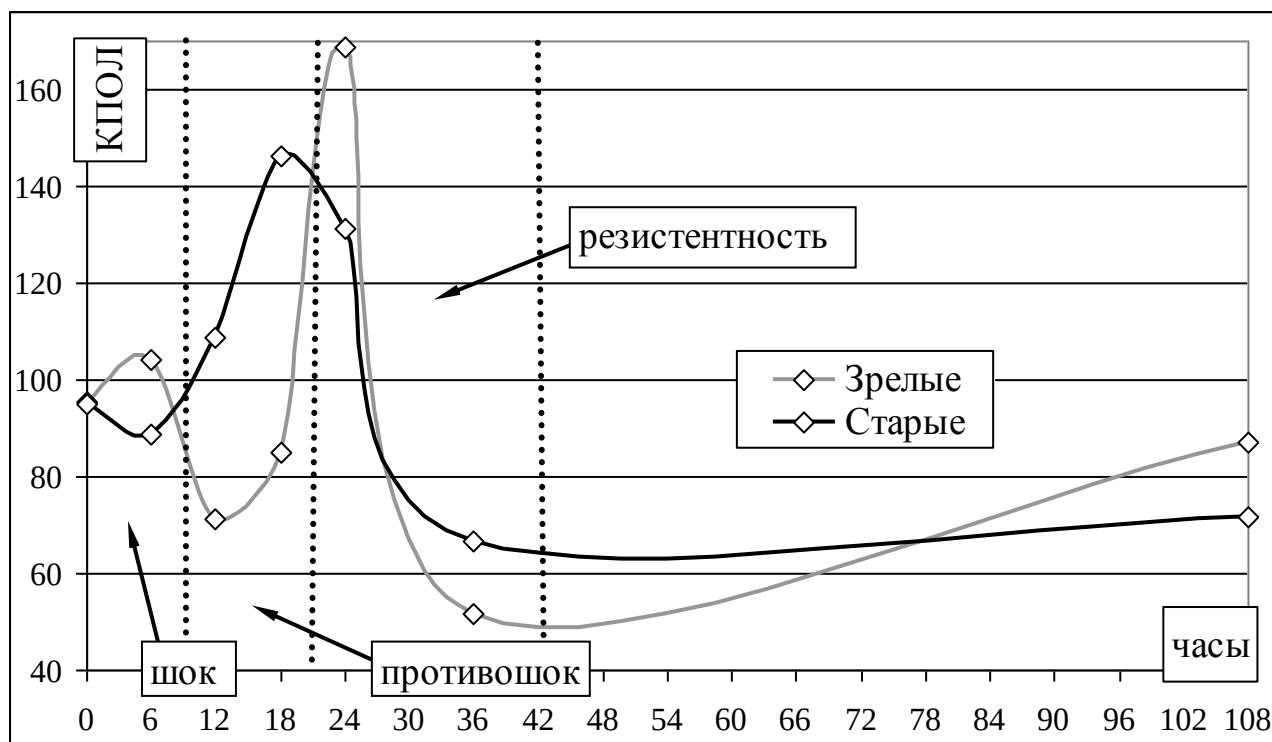


Рисунок 14 – Динамика коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) в межклеточной среде костного мозга зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Таблица 5 – Изменение величины коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ %) в межклеточной жидкости костного мозга зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

возраст крыс	контроль	иммобилизация		период после иммобилизации			
	0 часов	6 часов	12 часов	18 часов	24 часа	36 часов	108 часов
	время от начала эксперимента						
зрелые	95,3 ± 21,8	104,1 ± 33,4	71,2 ± 3,0	85,1 * ± 16,7	168,7 ** ± 41,6	51,6 ** ± 6,4	87,0 ± 11,0
старые	95,1 ± 11,4	88,6 ± 8,6	108,9 ± 37,7	146,4 ** ± 25,9	131,1 ** ± 23,5	66,6 ** ± 9,5	71,5 ± 15,9

Примечание: * $p < 0,05$ при сравнении двух возрастов;

** $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

Величина КПОЛ в МС костного мозга была несколько выше, чем величина КПОЛ в миелокариocyтах, причем все изменения КПОЛ в МС

происходили раньше, с опережением на 6 часов, чем непосредственно в миелокариоцитах. Этот факт, по нашему мнению, свидетельствует о том, что при иммобилизационном стресс-воздействии первичные изменения уровня ПОЛ происходили не в клетках, а в их окружении (межклеточная среда, капилляры, нервные волокна и их окончания). Первоначальное увеличение ПОЛ в межклеточной жидкости могло вызывать увеличение ПОЛ в миелокариоцитах костного мозга с последующим усилением гемопоза и выходом в кровь ретикулоцитов [108, 182, 183].

У старых крыс в МС костного мозга максимальное значение КПОЛ наблюдалось через 6 часов после иммобилизационного стресс-воздействия (фаза тревоги, 18 час эксперимента) (рисунок 14), тогда как в миелокариоцитах максимум КПОЛ приходился на более поздний срок - 12 часов после стресс-воздействия (фаза резистентности, 24 час эксперимента) (рисунок 12) и его величина была меньше в 1,3 раза. Это подтверждает выше высказанное мнение об участии межклеточной жидкости костного мозга в активировании процессов ПОЛ в миелокариоцитах при экстремальном воздействии.

У зрелых крыс, в отличие от старых крыс, величина КПОЛ в МС костного мозга ($168,7 \pm 41,7$) была приблизительно равна величине КПОЛ в миелокариоцитах ($169,2 \pm 39,8$) и все изменения КПОЛ в МС происходили одновременно с изменениями КПОЛ в миелокариоцитах, достигая максимума в фазе резистентности (таблица 4, 5).

Таким образом, у крыс зрелого возраста ответная реакция миелокариоцитов на увеличение уровня ПОЛ в МС костного мозга происходила синхронно, у крыс старого возраста эта ответная реакция была медленнее и запаздывала на 6 часов. Но как у старых, так и у зрелых животных, имело место влияние МС костного мозга на изменение интенсивности процессов ПОЛ в миелокариоцитах при иммобилизационном стресс-воздействии.

Корреляционный анализ уровня ПОЛ в миелокариоцитах и МС костного мозга подтвердил наличие связи между этими костномозговыми компонентами, коэффициент корреляции составил 0,61 ($p < 0,05$); активация процессов ПОЛ в МС костного мозга влияла на интенсивность ПОЛ в миелокариоцитах.

Центральная нервная система (ЦНС) одна из первых реагирует на любые экстремальные воздействия окружающей среды. Периферическая нервная система, объединяющая центральную нервную систему и органы, участвует в реализации реакций при стрессовых воздействиях. Поэтому возможно, что изменения уровня ПОЛ в ЦНС при стресс-воздействии вызывают аналогичные изменения в периферической нервной системе. Можно предположить, что изменения активности ПОЛ в ЦНС при психо-эмоциональном стресс-воздействии, могли индуцировать процессы ПОЛ в нервах и нервных окончаниях вегетативной нервной системы, входящих в состав МС костного мозга. Из этого следует, что активатором процессов ПОЛ в костном мозге при стресс-воздействии, может служить увеличение интенсивности ПОЛ в МС костного мозга за счет активации ПОЛ в нервах и нервных окончаниях вегетативной нервной системы, входящих в состав МС костного мозга (рисунок 15).



Рисунок 15 – Возможное участие центральной нервной системы (ЦНС) в активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в костном мозге при иммобилизационном стресс-воздействии

3.2.3 - Участие процессов перекисного окисления липидов в изменении количества ретикулоцитов периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Одной из реакций костного мозга на экстремальное воздействие служит изменение соотношения различных популяций делящихся и дифференцирующихся клеток, входящих в его состав [8, 41, 99, 174, 182]. Эти изменения, вероятно, протекают в костном мозге двумя путями: первый – перераспределение или миграция уже наработанных и дифференцированных клеток крови и костного мозга; второй – усиление пролиферации клеток одного типа и угнетение пролиферации клеток другого типа. Все это приводит к изменению в периферической крови состава специализированных клеток при возникновении условий повышенной потребности в них.

При изучении количества ретикулоцитов в крови интактных крыс, достоверных возрастных различий обнаружено не было, выявлялась лишь тенденция к более высоким показателям количества ретикулоцитов в крови зрелых крыс по сравнению со старыми крысами (рисунок 16).

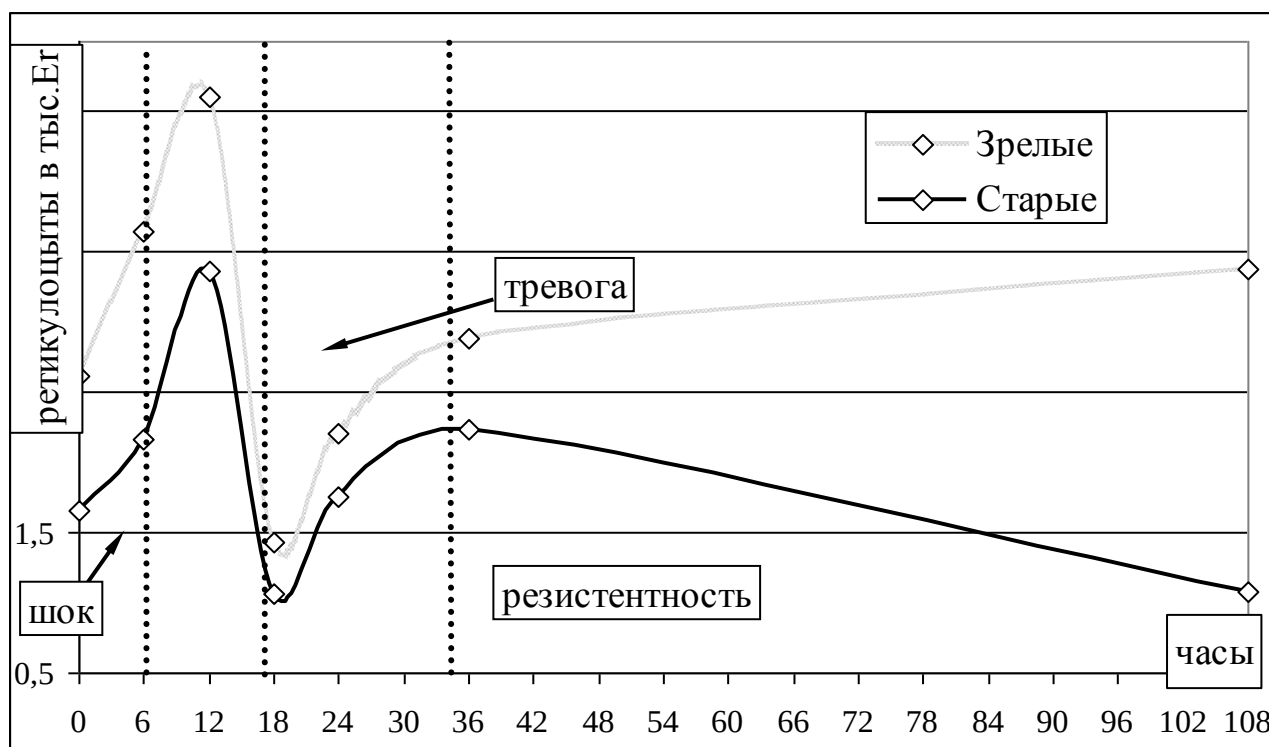


Рисунок 16 – Динамика количества ретикулоцитов (на тыс. эритроцитов – Er) в периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

При иммобилизационном стресс-воздействии количество ретикулоцитов, характеризующих морфофункциональное состояние костного мозга, изменялось в крови в соответствии с фазами стресс-синдрома. На протяжении всей стресс-реакции количество ретикулоцитов у зрелых крыс преобладало над их значениями у старых крыс (рисунок 16).

Увеличение количества ретикулоцитов в крови в начале развития общего адаптационного синдрома могло быть связано с миграцией этих клеток из костного мозга в кровь (рисунок 16). Через 12 часов иммобилизационного стресс-воздействия, в фазе шока, у зрелых крыс количество ретикулоцитов увеличивалось на 76,1% ($p>0,05$), у старых крыс - на 102,8% ($p<0,05$), по сравнению с контролем (таблица 6). По мере дальнейшего развития адаптационного синдрома с наступлением фазы противошока, количество ретикулоцитов в крови понижалось. Спустя 6 часов после окончания иммобилизационного стресс-воздействия (18 час эксперимента) количество ретикулоцитов в крови у зрелых крыс понижалось на 45,1% ($p<0,05$), у старых крыс - на 35,5% ($p>0,05$), по сравнению с контролем (таблица 6). Обнаруженное снижение количества ретикулоцитов на границе фаз тревога–резистентность можно связать с их созреванием в крови и уменьшением их резерва в красном костном мозге вследствие их миграции в периферическую кровь [99, 174, 41].

Таблица 6 – Изменение количества ретикулоцитов(на тыс.эритроцитов) в крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии

возраст крыс	контроль	иммобилизация		период после иммобилизации			
	0 часов	6 часов	12 часов	18 часов	24 часа	36 часов	108 часов
	время от начала эксперимента						
зрелые	26,2 ± 7,8	36,5 * ± 10,3	46,1 ± 17,5	14,4 * ± 2,7**	22,1 ± 4,1	28,8 ± 11,5	33,8 * ± 9,6
старые	16,6 ± 6,1	21,6 ± 0,6	36,1 ± 7,9**	10,7 ± 0,9	17,5 ± 3,1	22,3 ± 9,1	10,8 ± 4,5

*Примечание: * $p<0,05$ при сравнении двух возрастов;*

*** $p<0,05$ при сравнении с контрольной группой.*

В начале стадии резистентности (24 час эксперимента) происходило второе увеличение содержания ретикулоцитов в крови крыс при иммобилизационном стресс-воздействии (рисунок 16). Это можно связать с наступлением периода долгосрочной адаптации. В этом периоде поддержка

гомеостаза организма осуществлялась не за счет накопленных резервов организма, а - синтетических процессов, связанных с изменением в работе генетического аппарата и делением клеток.

По данным Меерсона Ф.З. с соавт. (1988) [101] при 6-часовой иммобилизации у крыс происходило двухфазное изменение репаративного синтеза ДНК. В период с 6 до 24 часов от начала стресс-воздействия в печени и почках активность репаративного синтеза ДНК достигала максимальных значений, а на вторые сутки - нормализовалась (рисунок 17). Используя эти данные, можно объяснить полученное увеличение количества ретикулоцитов в периферической крови при иммобилизационном стресс-воздействии (20-60 час эксперимента), (рисунок 16).

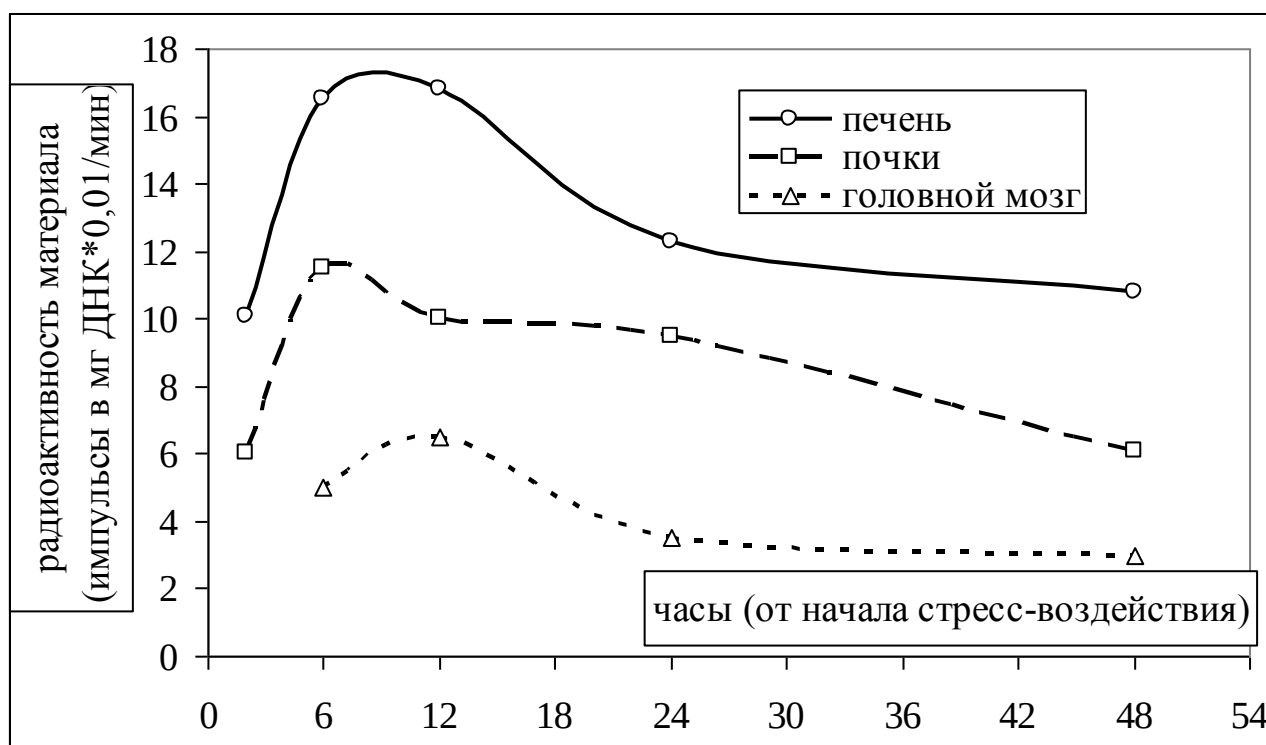


Рисунок 17 – Динамика репаративного синтеза ДНК при иммобилизационном стрессе (по данным Меерсона Ф.З., Пшенниковой М.Г., 1988) [101]

Спустя 12 часов от начала эксперимента количество ретикулоцитов у зрелых животных увеличилось на 10,3% ($p > 0,05$), у старых животных - на 34,8% ($p > 0,05$) по сравнению с контролем. При сравнении этих же показателей с 6 часом от начала эксперимента, когда количество ретикулоцитов минимально, у зрелых крыс их содержание увеличилось на 100,7% ($p < 0,05$), у старых крыс - на 109,1% ($p < 0,05$) (таблица 6).

Возможной причиной повышения количества ретикулоцитов может быть увеличение репаративного синтеза ДНК в организме в период с 6 по 24 час эксперимента (рисунок 17). Репаративный синтез ДНК в организме крыс при иммобилизационном стресс-воздействии являлся ответной реакцией клеток на увеличение повреждений в их структурах (в том числе и в ядре), вызванных усилением процессов ПОЛ [101, 102]. В течение 6 часов иммобилизационного стресс-воздействия, предшествующих увеличению репаративного синтеза ДНК, в костном мозге наблюдалась активация процессов ПОЛ (рисунок 12, таблица 4). Усиление репаративного синтеза ДНК, особенно в тканях с высокой пролиферацией (костный мозг, эпителиальные клетки и т.д.), могло приводить к активации деления ДНК, сопровождающихся в дальнейшем активацией деления клеток. При репарации большая часть ядерной ДНК, в нормальных условиях недоступная для ферментов из-за белков хроматина, начинала освобождаться и становиться доступной для транскрипции и репликации ДНК, что могло быть причиной деления клетки. Этот процесс мог быть пусковым механизмом, активирующим деление клеток при экстремальном воздействии, и, в частности, при увеличении количества ретикулоцитов в стадию резистентности при стресс-воздействии.

При сравнении динамики количества ретикулоцитов в крови между старыми и зрелыми крысами (рисунок 16) можно видеть, что на протяжении всего эксперимента количество ретикулоцитов в периферической крови зрелых крыс преобладало над аналогичными показателями у старых крыс. У зрелых крыс усредненное по всем стадиям стресс-реакции количество ретикулоцитов было больше на 69,4% ($p=0,0012$), по сравнению со старыми крысами (таблица 6). Корреляционный анализ интенсивности процессов ПОЛ миелокариоцитов и количества ретикулоцитов в периферической крови крыс продемонстрировал наличие между этими показателями прямой зависимости (коэффициент корреляции составил 0,73, $p<0,01$) (рисунок 18).

Как было отмечено выше, у зрелых крыс в костном мозге усредненный по всем стадиям стресс-реакции КПОЛ был на 25,3% ($p=0,056$) (таблица 4) больше, чем у старых крыс (рисунок 12). У старых крыс с возрастом

происходило уменьшение роли процессов ПОЛ в инициации процессов деления клеток, коэффициент корреляции количества ретикулоцитов и КПОЛ костного мозга у зрелых крыс больше на 42,9%, по сравнению со старыми крысами (коэффициент корреляции у зрелых крыс 0,69 ($p > 0,05$), у старых крыс 0,48 ($p > 0,05$)). Высокая интенсивность процессов ПОЛ в костном мозге у зрелых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии могла обеспечивать более высокую, по сравнению со старыми крысами, пролиферативную активность клеток, что влекло за собой быстрое возрастание количества ретикулоцитов в крови и тем самым ускоряло процессы адаптации организма.

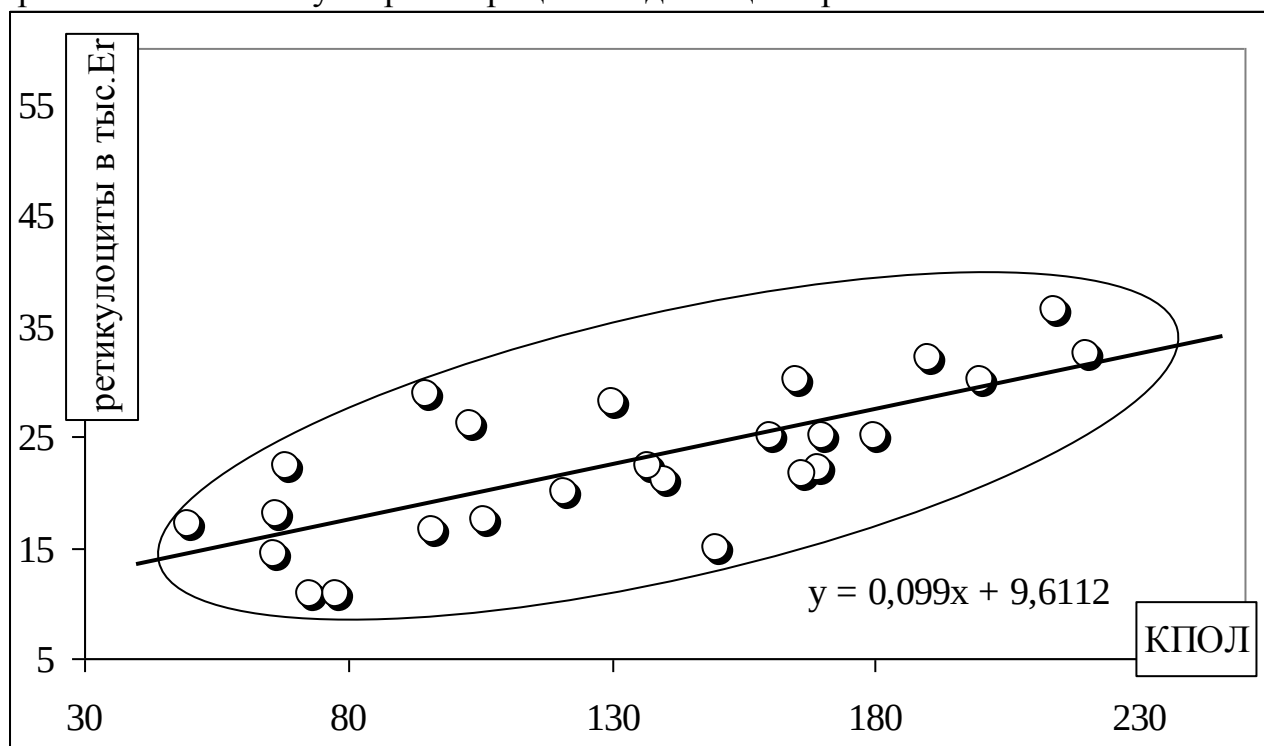


Рисунок 18 – Корреляционная зависимость между количеством ретикулоцитов в крови и коэффициентом перекисного окисления липидов (КПОЛ) в костном мозге у крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Увеличение интенсивности процессов ПОЛ в миелокариоцитах при экстремальном воздействии (иммобилизационное стресс-воздействие) в стадию шока приводило к нарастанию уровня повреждений в мембранных структурах клеток. Наличие в ядре эукариотических клеток двойной мембраны повышало вероятность активации перекисного окисления мембранных липидов в околоядерном пространстве клетки. Любые повреждения клеточных компартментов (ядро, митохондрии, аппарат Гольджи) сопровождалось усиленной работой репаративных механизмов, в том числе и механизмов

репарации ДНК. Для того чтобы поврежденные участки ДНК стали более доступны репаративным ферментам, они должны освободиться от ДНК-связывающих белков и их комплексов. Это могло увеличивать доступ к освобожденной спирали ДНК различных специфических ферментных систем, которые контролировали работу внутриядерных механизмов. Такая активация ДНК могла дополнительно приводить к активации механизмов синтеза мРНК и образованию репликативных «вилкок», приводящих к удвоению ДНК, делению ядра и всей клетки. При этих процессах в костном мозге происходило усиление активности пролиферации, что, в свою очередь, могло сопровождаться возрастанием количества ретикулоцитов в периферической крови.

3.2.4 - Участие фосфолипазы A₂ в изменении интенсивности процессов перекисного окисления липидов миелокариоцитов костного мозга зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Изучение активности фермента фосфолипазы A₂ (ФЛА₂) в миелокариocyтах интактных зрелых и старых крыс не показало между ними статистически достоверного различия. Было отмечено, что в миелокариocyтах старых крыс с возрастом наблюдалась незначительная тенденция к увеличению активности ФЛА₂.

Увеличение активности фермента ФЛА₂ при стресс-воздействии являлось одним из механизмов, приводящим к активации ПОЛ в тканях организма. Изменение активности ФЛА₂ в миелокариocyтах у зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии происходило в соответствии со стадиями стресса (шок, противошок (тревога), резистентность). Максимальная активность ФЛА₂ у крыс обоих возрастов приходилась на конец стадии тревоги и начало стадии резистентности (18 час эксперимента), (рисунок 19). У зрелых и старых крыс динамика изменения активности ФЛА₂ миелокариocyтов соответствовали динамике КПОЛ в межклеточной среде костного мозга (рисунок 14). Таким образом, у крыс при иммобилизационном стресс-воздействии фермент ФЛА₂ в некоторой степени способствовал увеличению активности ПОЛ в миелокариocyтах. Увеличение активности фермента ФЛА₂, могло приводить к увеличению количества субстрата для ПОЛ (свободные жирные кислоты), в

результате чего повышалась активность ПОЛ с выходом конечных продуктов (малоновый диальдегид, гидроперекиси, диеновые конъюгаты).

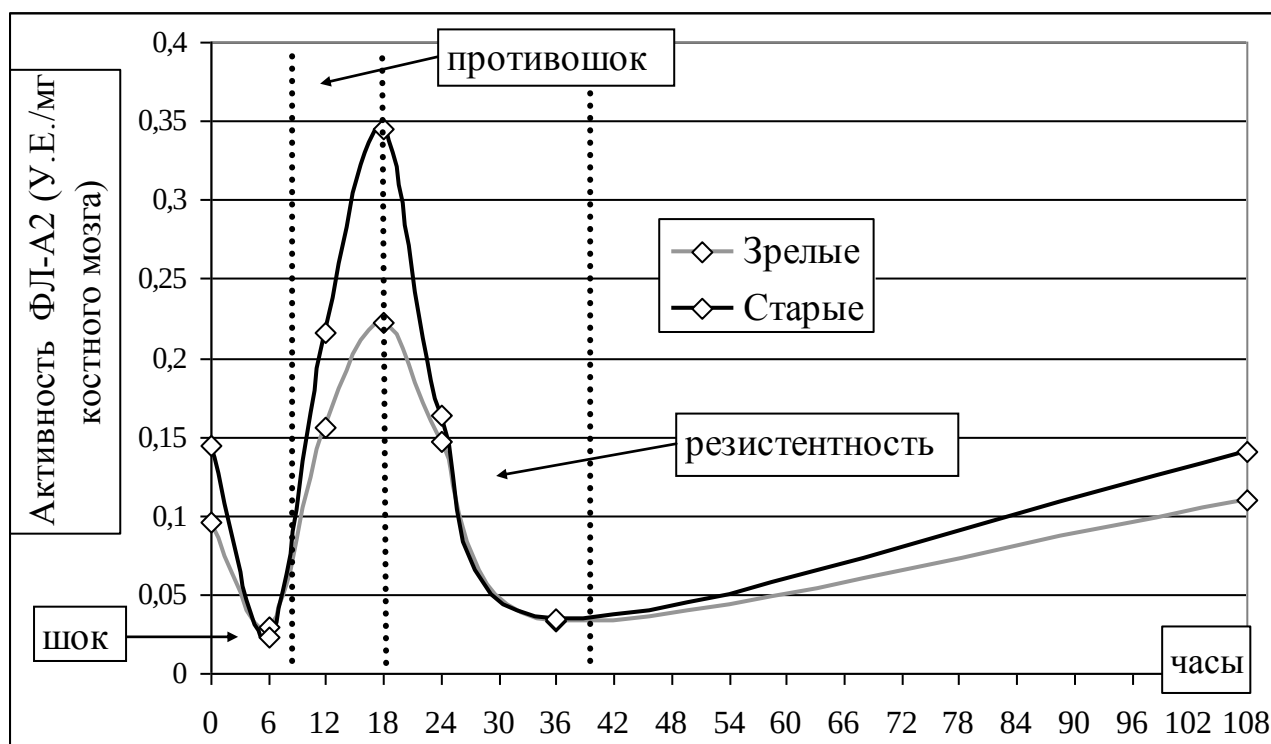


Рисунок 19 – Динамика активности фосфолипазы A2 в миелокариocyтах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

У старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии активность ФЛА2 миелокариocyтов в конце фазы тревоги (18 час эксперимента) была больше на 138,2% ($p < 0,05$), у зрелых – на 131,0% ($p = 0,057$), по сравнению с контролем одного возраста (таблица 7). Примерно в это же время (18 час эксперимента), в межклеточной среде костного мозга уровень ПОЛ также достигал максимума (таблица 5), и только через 6 часов максимум ПОЛ наступал в клетках костного мозга (таблица 4).

Таблица 7 – Изменение активности фосфолипазы A2 (ФЛА2, У.Е./мг) в миелокариocyтах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

возраст крыс	контроль	иммобилизация		период после иммобилизации			
	0 часов	6 часов	12 часов	18 часов	24 часа	36 часов	108 часов
	время от начала эксперимента						
зрелые	0,096 ± 0,041	0,030 ** ± 0,018	0,156 * ± 0,030	0,223 * ± 0,089	0,147 ** ± 0,006	0,033 ** ± 0,009	0,110 ± 0,015
старые	0,145 ± 0,014	0,023 ** ± 0,006	0,216 ** ± 0,028	0,345 ± 0,015	0,164 ± 0,029	0,034 ** ± 0,005	0,140 ± 0,107

Примечание: * $p < 0,05$ при сравнении двух возрастов;

** $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

При иммобилизационном стресс–воздействии активность ФЛА₂ в первую очередь усиливалась в межклеточной среде костного мозга, где и происходила первоначальная активация ПОЛ. В дальнейшем активность фосфолипазы А₂ увеличивалась в клетках костного мозга (гемопоэтические клетки стромы, адипоциты), где под влиянием фермента ФЛА₂ также могла происходить активация процессов ПОЛ, с последующим усилением деления клеток и увеличением в крови количества ретикулоцитов.

3.2.5 - Состояние антиокислительной активности в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии

Исследование коэффициента антиокислительной активности (КАОА) в миелокариоцитах интактных зрелых и старых крыс не показало между ними статистически достоверного возрастного отличия. В организме интактных крыс изменения антиокислительной активности (АОА) с увеличением возраста происходили незначительно, но под влиянием патологического фактора (иммобилизационное стресс-воздействие) возрастные различия в активности антиокислительной системы (АОС) начинали проявляться.

Известно что, состояние антиокислительной системы организма зависит от изменений в интенсивности процессов ПОЛ [91, 97, 189], то есть интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) влияет на активность АОС. При сравнении между собой величины КАОА и КПОЛ миелокариоцитов, можно отметить, что на всех стадиях развития стресс-реакции между ними наблюдалась обратно-пропорциональная зависимость, коэффициент корреляции составил $-0,52$ ($0,07 > p > 0,05$). Установленная корреляционная зависимость свидетельствовала о том, что система антиокислительной активности могла участвовать в регуляции процессов ПОЛ, но наличие обратной зависимости - свидетельствовало о том, что изменения антиокислительной системы отстают во времени от изменений в системе ПОЛ. Можно предположить, что первоначально происходили изменения в системе ПОЛ, которые впоследствии приводили к аналогичным изменениям в системе АОА. При этом величина КПОЛ миелокариоцитов крыс под действием АОС изменялся в 1,5-2 раза (таблица 4).

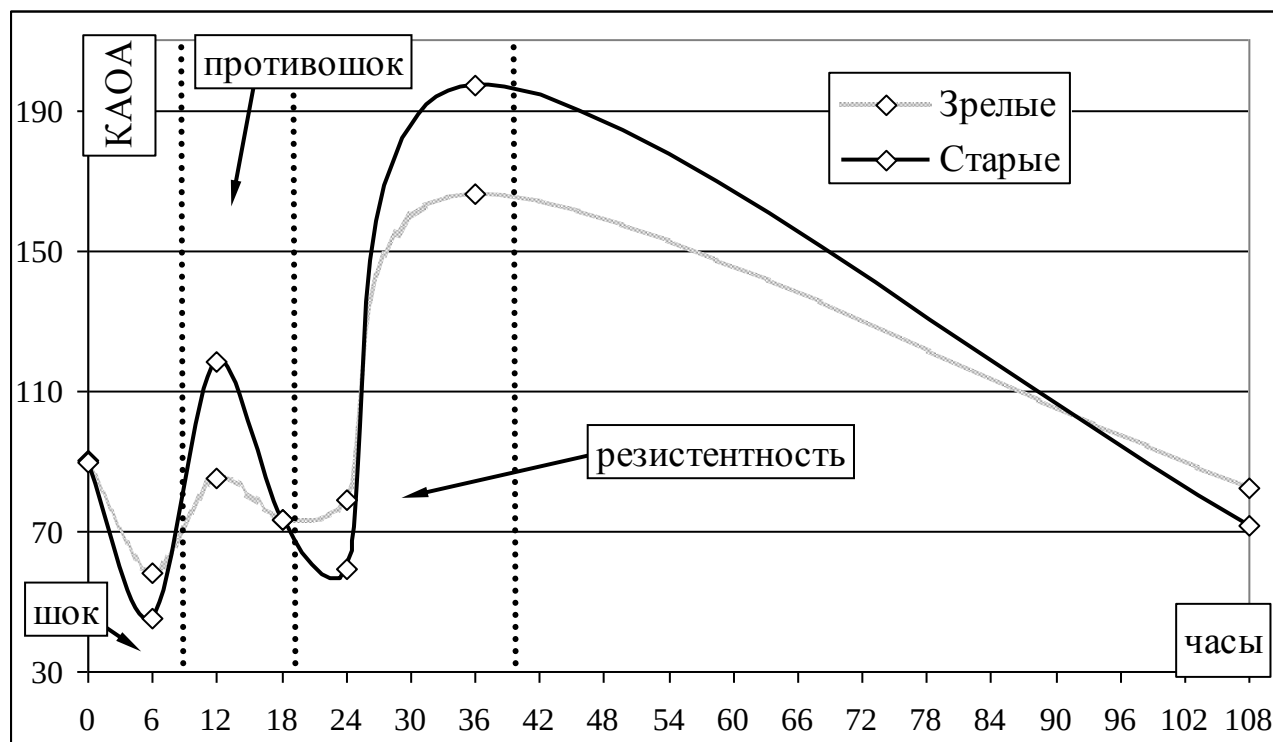


Рисунок 20 – Динамика коэффициента антиокислительной активности (КАОА) в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Таблица 8 – Изменения величины коэффициента антиокислительной активности (КАОА %) в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

возраст крыс	контроль	иммобилизация		период после иммобилизации			
	0 часов	6 часов	12 часов	18 часов	24 часа	36 часов	108 часов
	время от начала эксперимента						
зрелые	90,4 ± 7,3	58,4 ± 26,1	84,9 ± 25,7	73,0 * ± 8,6	78,8 ± 34,8	166,2 * ± 36,0	82,1 ± 30,7
старые	89,4 ± 10,0	45,1 * ± 18,1	118,1 ± 52,7	73,2 ± 17,9	59,1 * ± 13,3	197,1 * ± 37,3	71,8 ± 41,0

Примечание: * $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

При сравнении динамики КПОЛ (рисунок 12) и КАОА миелокариоцитов (рисунок 20) видно, что в начальных этапах развития стресс-реакции (шок, противошок) изменения КАОА не так значительны, как аналогичные изменения КПОЛ. Наличие обратной зависимости между КАОА и КПОЛ в миелокариоцитах крыс при стрессе может свидетельствовать о некотором отставании во времени изменений АОА. В стадии резистентности (24-36 час эксперимента) ситуация изменяется и величина КАОА в миелокариоцитах значительно возросла, у зрелых животных в этой стадии стресса КАОА

увеличивался на 83,8% ($p<0,05$), у старых животных - на 120,6% ($p<0,05$), по сравнению с контролем (таблица 8).

Такая динамика КАОА в миелокариocyтах могла быть связана с увеличением доли участия в процессах стресс-реакции как ферментативной, так и неферментативной АОС. В начале фазы резистентности (20-24 час эксперимента) при инициации в миелокариocyтах механизмов долговременной адаптации происходило увеличение активности как антиокислительных ферментов (АОФ), так и неферментативных антиоксидантов (рисунок 21). У зрелых животных в стадию резистентности (18-36 час эксперимента) в миелокариocyтах ферментативная АОА повышалась на 10,3% ($p>0,05$), по сравнению с неферментативной АОА. У старых крыс ферментативная АОА повышалась на 49,7% ($p<0,05$) по сравнению с неферментативной АОА. Это свидетельствует об уменьшении с возрастом доли вклада в общий антиокислительный статус костного мозга неферментативных антиоксидантов и восполнении их недостатка увеличением синтеза антиокислительных ферментов [26, 27, 68].

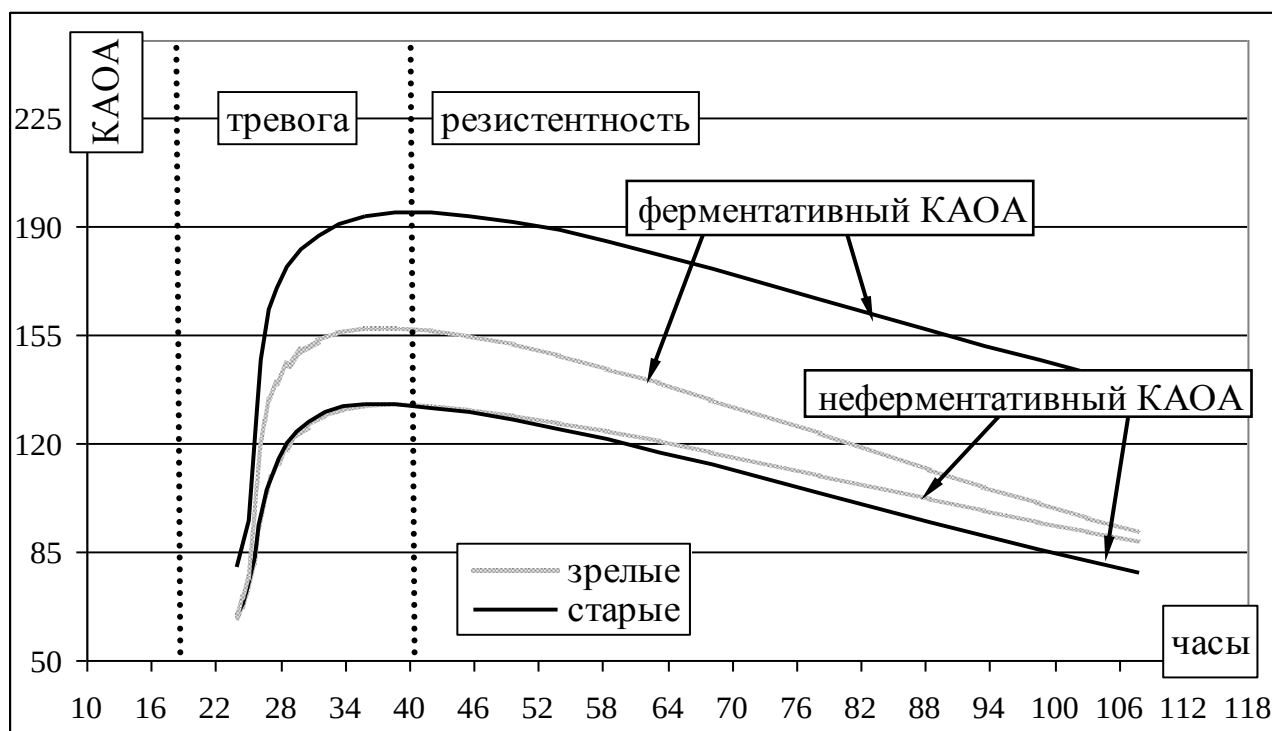


Рисунок 21 – Сравнительная динамика ферментативного и неферментативного коэффициентов антиокислительной активности (КАОА %) в миелокариocyтах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Таким образом, общий характер изменения системы ПОЛ и АОА миелокариоцитов при иммобилизационном стресс-воздействии в большинстве изученных сроков соответствовал изменениям ПОЛ и АОА в периферической крови. Полученные данные по динамике КПОЛ позволяют предположить, что изменения ПОЛ в костном мозге на начальных этапах развития стресс-реакции происходят сильнее и раньше, чем в периферической крови, а значит, они могут находиться под контролем более активно реагирующей на экстремальные воздействия нервной системы. На последующих этапах развития стресс-реакции контроль над процессами ПОЛ в костном мозге осуществлялся совместно с ферментативной и неферментативной АОС.

В заключении по главе можно отметить, что процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиокислительной активности (АОА) в организме крыс зрелого и старого возраста при иммобилизационном стресс-воздействии изменялись в зависимости от стадий стресс-реакции. Изменения величины интегрального коэффициента антиокислительной активности (КАОА) в системе крови крыс находились в противофазе к изменениям величины интегрального коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ). В стадии тревоги при развитии стресс-реакции в большей степени функционировала неферментативная антиокислительная система (АОС), в последующих стадиях активировалась ферментативная АОС.

С увеличением возраста изменения ПОЛ в системе крови старых крыс происходили на несколько часов раньше, и были менее значимы по величине, чем у зрелых крыс. У крыс старого возраста при иммобилизационном стресс-воздействии уменьшалось влияние неферментативных антиоксидантов на общую АОА системы крови, при этом активность антиокислительных ферментов компенсаторно усиливалась.

Увеличение КПОЛ в периферической крови крыс при иммобилизационном стресс-воздействии приводило к приросту ретикулоцитов в периферической крови, что подтверждалось наличием между ними прямой корреляционной зависимости. Это могло быть связано с миграцией ретикулоцитов из костного мозга в кровь на начальных стадиях стресса, а в

дальнейшем - активацией процессами ПОЛ пролиферации эритроидного ростка костного мозга. С увеличением возраста при стрессе происходило уменьшение активности костного мозга, выражающееся в ретикулоцитопении, что могло быть связано с возраст-зависимым уменьшением величины КПОЛ в миелокариocyтах.

ГЛАВА 4 - ВЛИЯНИЕ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ ВЕГЕТАТИВНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И АНТИОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ У ЗРЕЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕСС-ВОЗДЕЙСТВИИ

Известно, что с возрастом в нервной системе происходит усиление активности перекисного окисления липидов [5, 85, 108, 113, 185]. Наряду с этим, в условиях стресса возрастная инволюция приводит к снижению адаптивных возможностей нервной системы [171]. Вегетативная нервная система одной из первых реагирует на стресс-воздействие с ответной реакцией на уровне всех систем и органов организма [3, 35, 95, 182]. Имобилизационное воздействие, через психоэмоциональную активацию вегетативной нервной системы запускает в организме серию процессов с развитием стресс-реакции. Вегетативная нервная система опосредованно через гормоны и нейромедиаторы вовлекает внутренние системы и органы в стресс-реакцию с изменением их катаболизма и анаболизма [168, 170, 172]. В литературе недостаточно рассмотрен вопрос о взаимосвязи между изменениями ПОЛ при стрессе и изменениями в состоянии вегетативной нервной системы. Поэтому научный интерес представляют данные по изучению возрастной динамики вовлечения вегетативной нервной системы в регуляцию процессов ПОЛ и АОО при развитии стресса.

4.1 - Изучение действия адреналина и ацетилхолина на изменения перекисного окисления липидов и антиокислительную активность в периферической крови и костном мозге у зрелых и старых крыс при имобилизационном стресс-воздействии

Вегетативная нервная система подразделяется на симпатический и парасимпатический отделы. По ряду научных данных, симпатическая система является антагонистом парасимпатической системы, они оказывают различное, в некоторых случаях реципрокное, действие на ткани и системы органов [3, 13, 35, 182]. Симпатический и парасимпатический отделы вегетативной нервной системы иннервируют одни и те же органы, часто оказывая на них противоположное действие.

При стрессе первоначально активируется симпатическая система, которая увеличивает частоту и силу сердечных сокращений, сужает просвет кровеносных сосудов, повышает кровяное давление, тормозит двигательную и секреторную активность пищеварительной системы [19, 174]. За работу симпатической нервной системы отвечают нейромедиаторы норадреналин и адреналин.

Активация парасимпатической системы приводит к противоположному эффекту, который будет препятствовать развитию стресс-реакции. Парасимпатическая активация способствует снижению кровяного давления, снижению частоты и силы сердечных сокращений, увеличению как двигательной, так и секреторной активности пищеварительного тракта [35, 44]. Эта система регулирует работу внутренних органов в покое. За работу парасимпатической системы отвечает нейромедиатор ацетилхолин. Однако возрастные особенности этих взаимоотношений в литературе не описаны. Поэтому, актуально изучить особенности влияния адреналина и ацетилхолина на изменения ПОЛ и АОА в системе крови при развитии стресса, а также изменение этих процессов с возрастом при старении.

4.1.1 - Влияние ацетилхолина и адреналина на изменение интенсивности процессов перекисного окисления липидов и антиокислительную активность в периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

У старых интактных крыс величина коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) в сыворотке крови была меньше на 14% ($p > 0,05$), по сравнению со зрелыми крысами (таблица 9). Воздействие адреналина на интактных животных разного возраста приводило к уменьшению КПОЛ, у старых крыс КПОЛ уменьшился на 9% ($p > 0,05$), у зрелых животных КПОЛ уменьшился на 8% ($p > 0,05$). Воздействие ацетилхолина в тех же условиях не вызывало изменений ПОЛ в сыворотке крови зрелых и старых интактных крыс.

При изучении действия адреналина и ацетилхолина на фоне иммобилизационного стресс-воздействия были получены данные демонстрирующие уменьшение значения КПОЛ у животных.

Иммобилизационное стресс-воздействие на фоне введения адреналина приводило к снижению КПОЛ на 10% ($p>0,05$) в сыворотке крови старых крыс, воздействие парасимпатического нейромедиатора ацетилхолина также уменьшало значение КПОЛ на 7% ($p>0,05$) (таблица 9). В сыворотке крови зрелых крыс происходили аналогичные изменения, адреналин уменьшил КПОЛ на 22% ($p>0,05$), ацетилхолин уменьшил КПОЛ на 19% ($p>0,05$) (таблица 9).

Таблица 9 – Изменение величины коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ %) в крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и на фоне введения адреналина и ацетилхолина

название групп	старые		зрелые	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	92±24	94±10(1)	108±22	130±12(1)
адреналин	84±9	85±5	99±27	101±19
ацетилхолин	96±7	88±9	110±28	106±22

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Причины, приводящие к уменьшению КПОЛ при стрессе в крови зрелых и старых животных у адреналина и ацетилхолина различны. Возможно, предварительное воздействие адреналина на крыс перед иммобилизацией могло подготовить организм, и в частности АОС, к окислительному стрессу, вызванному стресс-воздействием. Таким образом, можно предположить, что воздействие адреналина на фоне иммобилизационного стресс-воздействия приводило к ускорению изменений ПОЛ в крови крыс. В данный момент эксперимента наблюдалось не окончание фазы противошока с ростом интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), как в контрольных группах (глава 3, рисунок 7), а стадия резистентности с уменьшением уровня ПОЛ.

При изучении влияния ацетилхолина на ПОЛ в крови крыс выявлялась иная закономерность. Ацетилхолин (парасимпатическая нервная система) является антагонистом к адреналину (симпатическая нервная система) и поэтому его введение могло в некоторой степени препятствовать действию симпатической нервной системы при стрессе [3, 13, 35, 182]. Данное конкурентное влияние на симпатическую нервную систему могло приводить к

замедлению изменений ПОЛ при иммобилизационном стресс-воздействии. Поэтому в этом эксперименте наблюдалось не окончание стадии тревоги или противошока (глава 3, рисунок 7), а стадия перехода от шока к противошоку, где уровень ПОЛ ниже нормы. При сравнении влияния нейрометаболитов на ПОЛ в крови между зрелыми и старыми крысами наблюдалось уменьшение их действия с возрастом, которое можно связать со снижением чувствительности рецепторов клеток у старых крыс [37, 113].

Таким образом, можно заключить, что адреналин ускорял изменения ПОЛ в сыворотке крови крыс при развитии стресс-реакции, а ацетилхолин напротив, приводил к замедлению изменений ПОЛ. У старых животных воздействие адреналина и ацетилхолина на систему ПОЛ было менее выражено из-за возрастного снижения чувствительности рецепторов клеток к медиаторам.

При изучении коэффициента антиокислительной активности (КАОА) в сыворотке крови у зрелых и старых крыс были получены данные, соответствующие изменению КПОЛ. Изучение КАОА в крови интактных животных не выявило различий между зрелыми и старыми крысами. Введение адреналина интактным крысам приводило к увеличению КАОА, у крыс старого возраста КАОА увеличился на 6% ($p>0,05$), у крыс зрелого возраста КАОА увеличился на 10% ($p>0,05$) (таблица 10).

Таблица 10 – Изменение величины коэффициента антиокислительной активности (КАОА %) у зрелых и старых крыс в сыворотке крови при иммобилизационном стресс-воздействии и на фоне введения адреналина и ацетилхолина

название групп	старые		зрелые	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	96±10	88±8 (2,3)	97±6 (5)	83±7 (4,5)
адреналин	102±6	107±8 (2)	107±7	99±6 (4)
ацетилхолин	90±3(1)	102±4 (1,3)	99±7	98±12

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Как было отмечено выше, предварительное введение адреналина крысам привело к активации ПОЛ в сыворотке крови, в ответ на это произошло увеличение общей АОА, что и нашло свое отображение в полученных результатах. Введение ацетилхолина контрольным крысам разного возраста не

повлияло на изменения показаний общей АОА в сыворотке крови.

Воздействие адреналина и ацетилхолина на фоне иммобилизации продемонстрировало увеличение значений КАОА в сыворотке крови старых и зрелых крыс. Воздействие адреналина при иммобилизации вызвало увеличение значений КАОА у старых крыс на 22% ($p < 0,05$), у зрелых крыс на 19% ($p < 0,05$) (таблица 10). Превентивное воздействие адреналина могло инициировать адаптационную реакцию организма, заключающуюся в активации АОС, в результате чего изменения КАОА, вызванные иммобилизацией, могли происходить быстрее. Поэтому, в данном случае наблюдалось не начало стадии резистентности с минимальным значением КАОА в сыворотке крови иммобилизованных крыс (глава 3, рисунок 8), а более позднее развитие стадии резистентности, связанное с увеличением КАОА в крови крыс.

Воздействие ацетилхолина перед иммобилизацией на зрелых и старых крыс также приводило к увеличению КАОА: у старых крыс в сыворотке крови КАОА увеличился на 16% ($p < 0,05$), у зрелых крыс увеличился на 18% ($p > 0,05$) (таблица 10), по сравнению с интактными крысами соответствующего возраста. Парасимпатический медиатор ацетилхолин оказывал тормозное, противоположное воздействие на системы и органы, которые активируются симпатической системой при стрессе [3, 13, 35, 182], поэтому влияние ацетилхолина могло приводить к замедлению изменений АОС при развитии стресс-реакции. В связи с чем, в эксперименте с воздействием ацетилхолина наблюдалось не начало стадии резистентности с минимальным значением КАОА, а середину более ранней стадии противошока с высокими показателями КАОА в сыворотке крови зрелых и старых животных. Изучение изменений КАОА в возрастном аспекте не выявило достоверных различий в сыворотке крови между старыми и зрелыми крысами.

При изучении нейромедиаторов у животных разного возраста в условиях иммобилизационного стресс-воздействия были получены данные, демонстрирующие наличие антагонизма в их действии на систему ПОЛ и АОА. Влияние симпатического нейромедиатора адреналина на фоне иммобилизации приводило к ускорению изменений процессов ПОЛ и АОА в сыворотке крови

зрелых и старых животных. Введение парасимпатического нейромедиатора ацетилхолина, как антагониста симпатической нервной системы, приводило к замедлению изменений ПОЛ и АОА, вызванных иммобилизационным стресс-воздействием. Адреналин в сыворотке крови крыс зрелого и старого возраста ускорял изменения ПОЛ и АОА при стрессе, ацетилхолин замедлял их изменения. У старых крыс воздействие адреналина и ацетилхолина на процессы ПОЛ и АОА в крови приводило к менее выраженным изменениям, чем у крыс зрелого возраста. Это могло произойти в результате возраст-зависимого снижения чувствительности рецепторов клеток у старых крыс к адреналину и ацетилхолину.

4.1.2 - Влияние ацетилхолина и адреналина на изменения интенсивности процессов перекисного окисления липидов и антиокислительную активность миелокариоцитах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

Сравнение интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в миелокариоцитах между зрелыми и старыми интактными крысами не показало достоверного различия (таблица 11).

Таблица 11 – Изменение величины коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ %) в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и на фоне введения адреналина и ацетилхолина

название групп	старые		зрелые	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	98±21	109±13(1)	100±8	143±14(1)
адреналин	98±17	93±8	103±7	124±28
ацетилхолин	105±16	93±21	123±20	112±17

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p < 0,05$).

Введение адреналина до иммобилизационного воздействия зрелым и старым крысам не приводило к изменениям КПОЛ в миелокариоцитах. Как было отмечено в третьей главе, изменения ПОЛ в миелокариоцитах могли происходить благодаря первоначальным изменениям в межклеточной среде костного мозга. Кроме того, костный мозг, по сравнению с кровью, активнее и раньше реагировал на изменения ПОЛ при экстремальных воздействиях [41,

108, 183]. Поэтому воздействие адреналина на организм крыс могло привести к преждевременной инициации некоторых механизмов адаптации к стрессу, в виде активации антиокислительной активности (АОА) в костном мозге. В свою очередь увеличение интенсивности АОА в миелокариocyтах костного мозга крыс приводило к инактивации ПОЛ. Поэтому в эксперименте не наблюдалось значимых изменений КПОЛ в миелокариocyтах при воздействии адреналина.

Введение ацетилхолина до иммобилизации зрелым и старым крысам приводило к тенденции увеличения КПОЛ в миелокариocyтах (таблица 11). У старых крыс ацетилхолин вызывал увеличение КПОЛ в миелокариocyтах на 7% ($p < 0,05$), у зрелых крыс значение КПОЛ увеличивалось на 23% ($p < 0,05$), по сравнению с интактными крысами. Ацетилхолин – это короткоживущий нейромедиатор, который быстро инактивируется ферментом ацетилхолинэстеразой (КФ 3.1.1.7). По некоторым данным, свободный ацетилхолин может накапливаться в эритроцитах и клетках костного мозга [247, 205, 62]. Действие ацетилхолина сопряжено с образованием NO (оксида азота), который может влиять на увеличение ПОЛ в мембранах клеток [35, 42, 96]. Поэтому представляется возможным выдвинуть следующее предположение, что некоторое количество свободного ацетилхолина в клетках костного мозга крыс способно связываться и депонироваться. Впоследствии ацетилхолин высвобождается и через NO-систему при одновременном увеличении концентрации ионов кальция увеличивает активность ПОЛ. Можно также предположить, что в результате действия этого механизма в межклеточном окружении клеток костного мозга крыс, увеличение ПОЛ может происходить интенсивнее, чем в миелокариocyтах.

Изучение влияния адреналина и ацетилхолина на миелокариocyты зрелых и старых крыс при иммобилизации подтвердило вышесказанное предположение о влиянии этих нейрометаболитов на скорость изменений ПОЛ и АОА при развитии стресс-реакции. Введение адреналина старым и зрелым крысам приводило к ускорению изменений процессов ПОЛ в миелокариocyтах, поэтому в данном эксперименте наблюдалось не начало стадии резистентности с высоким уровнем ПОЛ, а ее развитие с приведением уровня ПОЛ в норму

(глава 3, рисунок 12). У зрелых и старых животных уровень КПОЛ при воздействии адреналина на клетки костного мозга в среднем уменьшился на 14% ($p>0,05$) (таблица 11), по сравнению с интактными крысами.

Введение животным ацетилхолина приводило к обратному эффекту, к замедлению изменений процессов ПОЛ, и в данном опыте наблюдалось не начало стадии резистентности, а предшествующая ей середина фазы противошока (глава 3, рисунок 12). У старых крыс введение ацетилхолина в условиях иммобилизации уменьшало КПОЛ в миелокариocyтах на 15% ($p>0,05$), у зрелых крыс произошло уменьшение КПОЛ на 22% ($p>0,05$) (таблица 11), по сравнению с интактными крысами аналогичного возраста.

Таким образом, можно резюмировать, что адреналин и ацетилхолин как нейромедиаторы симпатической и парасимпатической нервной системы действовали на систему ПОЛ/АОА миелокариocyтов, так же как и на периферическую кровь. При нормальных условиях адреналин не влиял на изменения интенсивности ПОЛ в миелокариocyтах костного мозга из-за более высокой реактивности АОС. В свою очередь ацетилхолин увеличивал уровень ПОЛ в миелокариocyтах, что можно связать с поэтапным освобождением связанного ацетилхолина из этих клеток и его дальнейшим действием, приводящим к увеличению ПОЛ в миелокариocyтах и межклеточной среде (МС) костного мозга.

При изучении воздействия нейромедиаторов на фоне иммобилизационного воздействия, были получены данные показывающие наличие антагонизма между адреналином и ацетилхолином в их действии на систему ПОЛ и АОА. Адреналин в клетках костного мозга у зрелых и старых крыс ускорял изменения ПОЛ и АОА при стрессе, ацетилхолин напротив, замедлял изменения ПОЛ и АОА.

Изучение процессов ПОЛ в МС костного мозга зрелых и старых интактных крыс не выявило между ними возрастного различия (таблица 12). Введение адреналина до иммобилизации зрелым и старым крысам не привело к проявлению изменений ПОЛ в МС костного мозга, возможно, это связано с большей реактивностью АОС в МС костного мозга. Введение ацетилхолина до

иммобилизации крысам зрелого и старого возраста привело к увеличению значения КПОЛ в МС костного мозга. У старых крыс величина КПОЛ в межклеточной среде (МС) костного мозга после введения ацетилхолина увеличился на 36% ($p>0,05$), у зрелых крыс КПОЛ увеличился на 27% ($p>0,05$) (таблица 12), по сравнению с интактными крысами.

Таблица 12 - Изменение величины коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ %) у зрелых и старых крыс в межклеточной среде костного мозга при иммобилизационном стресс-воздействии и на фоне введения адреналина и ацетилхолина

название групп	старые		зрелые	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	93±21(3)	121±17	92±15(3)	142±22(1,2)
адреналин	99±13	104±27	95±13	109±10(1)
ацетилхолин	127±17	105±23	117±33	86±15(2)

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Это могло происходить в результате пролонгированного прооксидантного действия ацетилхолина, связанного с постепенным высвобождением нейромедиатора из клеток, а в дальнейшем - к выходу в МС костного мозга ионов кальция, которые способствовали увеличению активности фермента ФЛА₂ продуцирующего субстрат для активации процессов ПОЛ [95]. С другой стороны, действие ацетилхолина на рецепторы клеток сопряжено с активацией фермента NO-синтазы (NOS) (КФ 1.14.13) и образованием нейромедиаторного посредника оксида азота NO. Оксид азота, согласно некоторым данным, способен активировать образование активных форм кислорода [205], что в итоге приводит к активации ПОЛ в клетках и тканях организма.

Введение адреналина и ацетилхолина при иммобилизационном стресс-воздействии зрелым и старым крысам приводило к изменению скорости протекания реакций ПОЛ в МС костного мозга. Адреналин в МС костного мозга зрелых и старых крыс ускорял изменения ПОЛ при иммобилизационном стресс-воздействии, ацетилхолин вел себя как антагонист к адреналину, с замедлением изменений ПОЛ в тех же условиях. Введение адреналина крысам зрелого и старого возраста при иммобилизационном стресс-воздействии

приводило к уменьшению показателей КПОЛ в МС костного мозга, у старых крыс КПОЛ уменьшился на 14% ($p>0,05$), у зрелых крыс - на 23% ($p<0,05$) (таблица 11), по сравнению с интактными крысами. Так как под влиянием адреналина происходило ускорение изменений ПОЛ при стрессе, то в данном случае наблюдалось не начало стадии резистентности (глава 3, рисунок 14), а ее середина, с понижением уровня ПОЛ в межклеточной среде костного мозга крыс.

В случае использования ацетилхолина наблюдался противоположный эффект - происходило замедление изменений ПОЛ при стресс-реакции на иммобилизацию. Ацетилхолин в МС костного мозга старых крыс при стрессе уменьшал КПОЛ на 13% ($p>0,05$), у зрелых крыс - на 39% ($p<0,05$) (таблица 12), по сравнению с интактными крысами.

При изучении межклеточной среды (МС) красного костного мозга было выяснено, что изменения процессов ПОЛ в МС костного мозга происходили сильнее, чем непосредственно в костном мозге. Поэтому можно предположить, что большинство изменений ПОЛ в миелокариocyтах костного мозга происходили вследствие первоначальной активации этих процессов в МС костного мозга.

При анализе возрастных различий изменений КПОЛ в миелокариocyтах и в МС костного мозга были получены данные, демонстрирующие уменьшение с возрастом способности отвечать на воздействия нейрометаболитов. Возможно, с возрастом у старых крыс наблюдается уменьшение способности рецепторов клеток связываться с адреналином и ацетилхолином. Происходит возрастная деградация процессов связывания нейромедиаторов или гормонов с белковыми рецепторами на поверхности клеток, или другими словами – «старение рецепторов» [5, 113].

При изучении изменения величины КАОА в миелокариocyтах у зрелых и старых крыс были получены данные, коррелирующие с результатами по изменению КПОЛ. У интактных зрелых и старых крыс возрастных различий в изменении величины КАОА выявлено не было. Воздействие адреналина также не привело к значимым изменениям величины КАОА в миелокариocyтах

зрелых и старых крыс (таблица 13), в данном случае имел место этап завершения действия адреналина на организм животных с возвращением показателей КАОА миелокариоцитов к первоначальным значениям. Введение ацетилхолина до иммобилизации животным разного возраста вызывало некоторое увеличение КАОА, которое может быть результатом ответной реакции системы АОА на увеличение количества свободных радикалов. У старых крыс введение ацетилхолина до иммобилизации увеличило значение КАОА в миелокариоцитах на 11% ($p>0,05$), у зрелых крыс - на 28% ($p>0,05$), (таблица 13), по сравнению с интактными крысами.

Таблица 13 – Изменение величины коэффициента антиокислительной активности (КАОА %) у зрелых и старых крыс в миелокариоцитах при иммобилизационном стресс-воздействии и на фоне введения адреналина и ацетилхолина

название групп	старые		зрелые	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	91±28	63±9(1, 2)	89±14	74±12(3)
адреналин	83±8(4)	122±13(1, 4)	89±13(5)	129±13(3, 5)
ацетилхолин	101±16	100±17(2)	114±30	86±11

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Изучение действия нейромедиаторов на систему АОА миелокариоцитов крыс при развитии стресс-реакции на иммобилизационное воздействие, подтвердило выше сказанное предположение об ускорении или замедлении интенсивности реакций АОА, в зависимости от вида нейромедиатора. Воздействие адреналина на животных существенно увеличивало величину КАОА в миелокариоцитах старых крыс на 94% ($p<0,05$), зрелых крыс – на 74% ($p<0,05$) (таблица 13), по сравнению с интактными животными. При сравнении полученных данных по влиянию адреналина на КАОА миелокариоцитов в условиях иммобилизации (глава 4, таблица 13) с данными по динамике КАОА при развитии стресс-реакции в костном мозге (глава 3, рисунок 20), можно отметить, что адреналин мог приводить к ускорению изменений АОА в костном мозге. В результате воздействия адреналина на миелокариоциты крыс в условиях иммобилизации наблюдалось не начало стадии резистентности (глава 3, рисунок 20), а более поздний этап развития стадии резистентности с

увеличением КАОА в миелокариоцитах.

Введение ацетилхолина зрелым и старым крысам при стрессе приводило к замедлению изменений в АОА миелокариоцитах, при этом наблюдалось не начало фазы резистентности (глава 3, рисунок 20), а более ранний этап - середина стадии противошока с тенденцией увеличения значений КАОА. У старых крыс при иммобилизации и после введения ацетилхолина уровень КАОА в костном мозге увеличился на 58% ($p < 0,05$), у зрелых крыс - на 16% ($p < 0,05$) (таблица 13), по сравнению с интактными крысами. Таким образом, как и в ситуации с изменением величины КПОЛ, имел место эффект ускорения изменения АОА в миелокариоцитах при воздействии адреналином и эффект замедления изменения АОА при воздействии ацетилхолином.

Эффект от воздействия адреналина и ацетилхолина на миелокариоциты костного мозга был сильнее по сравнению с воздействием этих же нейромедиаторов на периферическую кровь. При сравнении показателей КПОЛ и КАОА между периферической кровью и миелокариоцитами можно прийти к выводу, что миелокариоциты были более показательны в изменении данных параметров. То есть, реактивность миелокариоцитов и межклеточного окружения на экстремальное воздействие или введение нейрометаболитов была интенсивнее, чем реактивность периферической крови.

Наиболее сильно на воздействие нейромедиаторов реагировала межклеточная среда костного мозга, возможно являясь первопричиной дальнейших изменений ПОЛ и АОА непосредственно в клетках костного мозга. Введение старым и зрелым крысам адреналина не значительно влияло на изменения величины КПОЛ и КАОА, что возможно связано с высокой эффективностью реакции клеток костного мозга на увеличение количества свободных радикалов, возникшее в результате действия катехоламинов [13, 99]. Ацетилхолин, напротив, способствовал поддержанию повышенного уровня ПОЛ в клетках костного мозга, возможно, это могло происходить в результате постепенного высвобождения связанного ацетилхолина и его влияния на активацию NO-синтазы и ФЛА₂, способствующих образованию свободных радикалов [35, 42, 96].

При стрессе в миелокариоцитах и МС костного мозга зрелых и старых крыс адреналин вызывал ускорение изменения ПОЛ и АОА, ацетилхолин замедлял изменения ПОЛ и АОА. Все выявленные в миелокариоцитах и МС костного мозга возрастные различия по влиянию нейрометаболитов на ПОЛ и АОА являются результатом ослабления с возрастом качества работы рецепторного аппарата клетки. Рецепторов с возрастом становится меньше, в белковых субъединицах рецепторов накапливаются ошибки, что может приводит к снижению интенсивности качества связи между нейромедиатором и рецептором, а также к нарушению передачи внутриклеточных сигналов другим посредникам в клетке [37, 74, 171]

4.2 - Изучение действия адреналина и ацетилхолина на процессы перекисного окисления липидов в миелокариоцитах зрелых и старых крыс *in vitro*

Адреналин и ацетилхолин в результате действия специфических ферментных систем *in vivo* в организме быстро инактивируются. Вследствие этого, действие адреналина и ацетилхолина на организм *in vivo* является не продолжительным. Адреналин в крови и костном мозге разрушается через реакции окислительного дезаминирования под действием моноаминоксидаз или метилтрансфераз [209, 253, 284]. Ацетилхолин в организме инактивируется еще быстрее под действием холинэстеразы [35, 328]. Кроме того, в костном мозге помимо миелокариоцитов находятся другие клетки и клеточные структуры (адипоциты, нервные окончания, кровеносные сосуды соединительно-тканые компоненты), которые также вносят свой вклад в изменения процессов ПОЛ и АОА при действии адреналина и ацетилхолина. В литературе имеются единичные данные описывающие действие адреналина и ацетилхолина на ПОЛ в миелокариоцитах *in vitro*. Поэтому представляет интерес изучить действие адреналина и ацетилхолина на изолированные клетки костного мозга (миелокариоциты).

4.2.1 - Изменение перекисного окисления липидов в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при инкубации с адреналином *in vitro*

В миелокариоцитах интактных (контроль) зрелых крыс *in vitro* величина

коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) была больше на 8% ($p<0,05$), по сравнению со старыми крысами (таблица 14, рисунок 22). Полученный результат можно объяснить тем, что с возрастом в мембранах миелокариоцитов может происходить увеличение доли липидной составляющей с преобладанием холестерина и других слабоокисляемых липидов (насыщенные жирные кислоты), которые препятствуют распространению процессам липопероксидации.

Таблица 14 – Динамика величины коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ %) в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при инкубации с адреналином in vitro

Группы Время (с)	Старые	Зрелые
контроль	96,3 ±2,2	103,7 ±1,9**
5	109,3 ±9,9*	123,4 ±4,9*
10	124,8 ±8,5*	122,4 ±6,1*
20	123,2 ±2,9*	116,9 ±3,5*
40	114,9 ±5,0*	115,8 ±2,4*
60	113,6 ±3,3	116,5 ±0,3*
180	82,4 ±8,8*	105, ±3,0**
600	76,2 ±4,1*	107,9 ±6,5**
1800	97,1 ±2,1	93,4 ±1,1* **
3600	93,6 ±2,2	109,9 ±5,5**
5400	93,8 ±7,1	119,1 ±7,4* **
7200	100,7 ±6,1	103,5 ±8,6

Примечание: * $p<0,05$ при сравнении с контролем (0 секунд);

** $p<0,05$ при сравнении со старыми крысами.

Внесение адреналина в инкубационную среду с миелокариоцитами зрелых и старых крыс приводило к увеличению КПОЛ в этих клетках. При исследовании в возрастном аспекте было выявлено, что максимальный подъем КПОЛ у зрелых крыс наблюдался на 5 секунде эксперимента (КПОЛ увеличился на 20% ($p<0,05$), а у старых крыс - на 10 секунде КПОЛ увеличился на 28% ($p<0,05$), по сравнению с нормой), (таблица 14, рисунок 22). Такое возрастное различие, выраженное в более поздней активации КПОЛ у старых крыс, свидетельствует в пользу того, что с возрастом количество и качество рецепторов (адренорецепторы) на миелокариоцитах уменьшается, что может быть причиной поздней, по сравнению со зрелыми крысами, реакции на введение адреналина и увеличение ПОЛ.

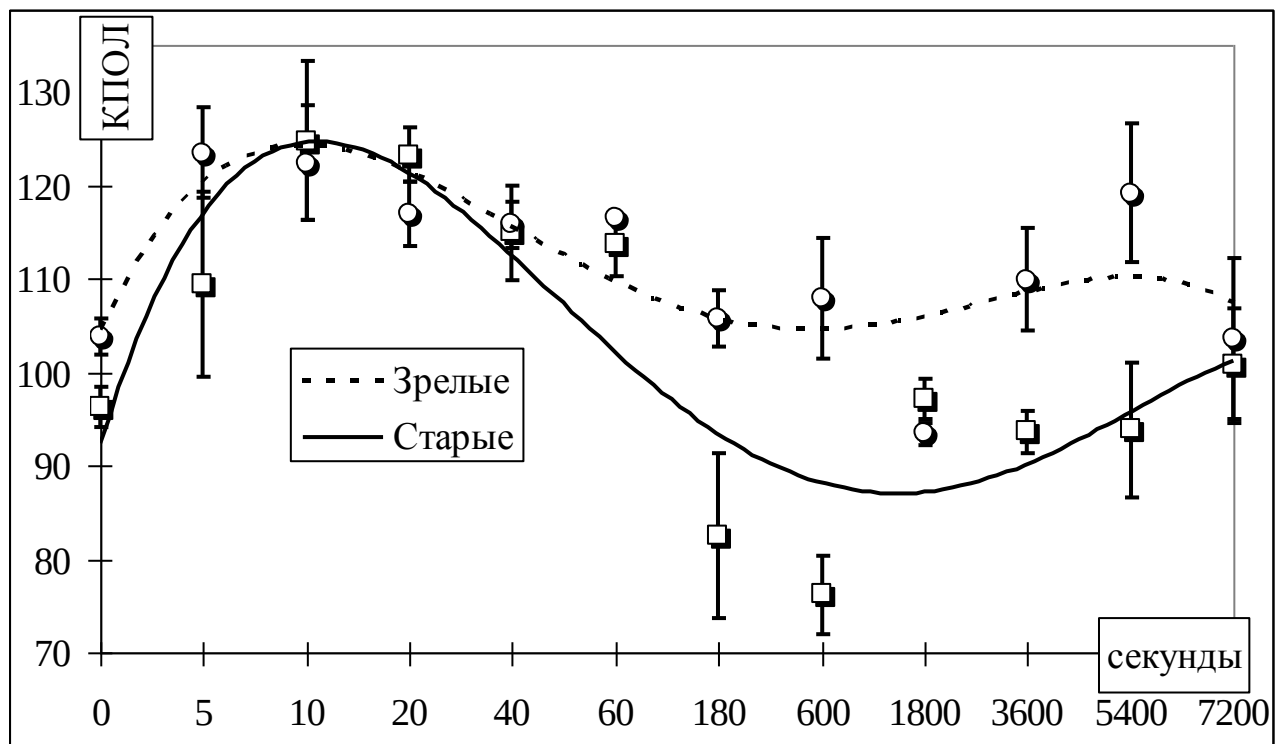


Рисунок 22 – Изменение величины коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) в миелокариocyтах зрелых и старых крыс при инкубации с адреналином *in vitro*

Через некоторое время после увеличения КПОЛ, вызванного адреналином, в исследуемых клетках животных происходило закономерное понижение его уровня. Максимальное понижение, как в клетках старых, так и зрелых крыс происходило через 3 минуты после добавления в инкубационную среду адреналина. У зрелых крыс величина КПОЛ в инкубируемых миелокариocyтах понизилась на 18% ($p < 0,05$), по сравнению с максимальным увеличением, произошедшим на 5 секунде; у старых крыс – на 32% ($p < 0,05$), по сравнению с максимумом на 10 секунде (таблица 14, рисунок 22).

При сравнении динамики КПОЛ в миелокариocyтах между зрелыми и старыми крысами можно сделать вывод, что на протяжении всего эксперимента в клетках зрелых крыс уровень КПОЛ был выше, чем в клетках старых крыс, но амплитуда изменения КПОЛ, в свою очередь, была значимее выше в клетках старых крыс (рисунок 22). У старых крыс в кроветворном микроокружении костного мозга преобладает липидная фракция с повышенным содержанием слабовосприимчивых к перекисному окислению липидов. Это, в первую очередь, холестерин и насыщенные жирные кислоты, которые могут выполнять функцию структурных антиоксидантов. Холестерин и насыщенные жирные

кислоты своим непосредственным нахождением в месте повышенного перекисного окисления препятствуют распространению свободных радикалов, либо связываясь с ними, либо игнорируя их. В данном случае у старых крыс неферментативная антиокислительная система усиливается структурным антиоксидантным эффектом липидов, у зрелых крыс их меньше и поэтому величина КПОЛ в миелокариocyтах зрелых крыс была больше, чем у старых (таблица 14, рисунок 22).

Как было отмечено выше, введение адреналина в инкубационную среду вызывало увеличение ПОЛ в миелокариocyтах обоих возрастов. Дальнейший «сценарий» изменения ПОЛ в этих клетках развивается в соответствии с теми условиями, которые имеются в клетках. Причина увеличения ПОЛ при введении адреналина могла заключаться в катаболической природе гормона [40, 75]. В клетке, после серии различных реакций, вызванных адреналином, могло происходить увеличение количества распадов макромолекул до их составляющих, в частности триглицеридов и фосфолипидов до жирных кислот, которые являются основным субстратом ПОЛ. Тем самым фоновый уровень ПОЛ, который присутствует в норме в каждой клетке, может увеличиваться (рисунок 23).

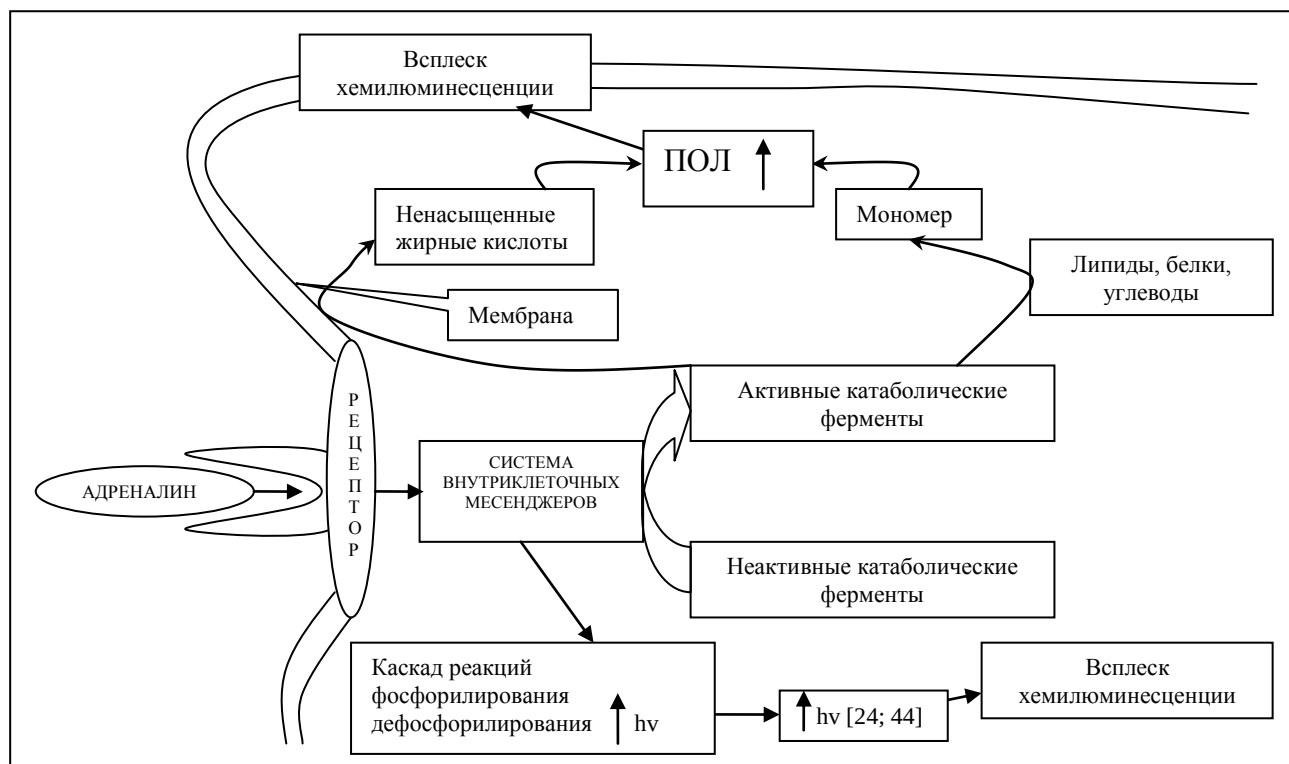


Рисунок 23 – Схема механизма приводящего к увеличению интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и хемилюминесценции при воздействии на миелокариocyты адреналином *in vitro*

При изучении ПОЛ в инкубируемых миелокариocyтах, было обнаружено явление биолуминесценции с возможной активацией ПОЛ. Введение адреналина в инкубационную среду клеток в соотношении 4 молекулы нейромедиатора на 1 миелокариocyт приводило к многократному увеличению свечения при хемилуминесцентном анализе. Максимальное увеличение свечения в миелокариocyтах зрелых крыс наблюдалось через 17 секунде после введения адреналина, (свечение увеличилось в 6 раз) у старых крыс через 11 секунде (свечение увеличилось в 12,5), (рисунок 24). Подобное увеличение свечения может быть вызвано двумя причинами. Первая причина – это свечение, вызванное увеличением ПОЛ в результате катаболического воздействия адреналина, что увеличило количество субстрата для свободно-радикальных реакций (рисунок 23).

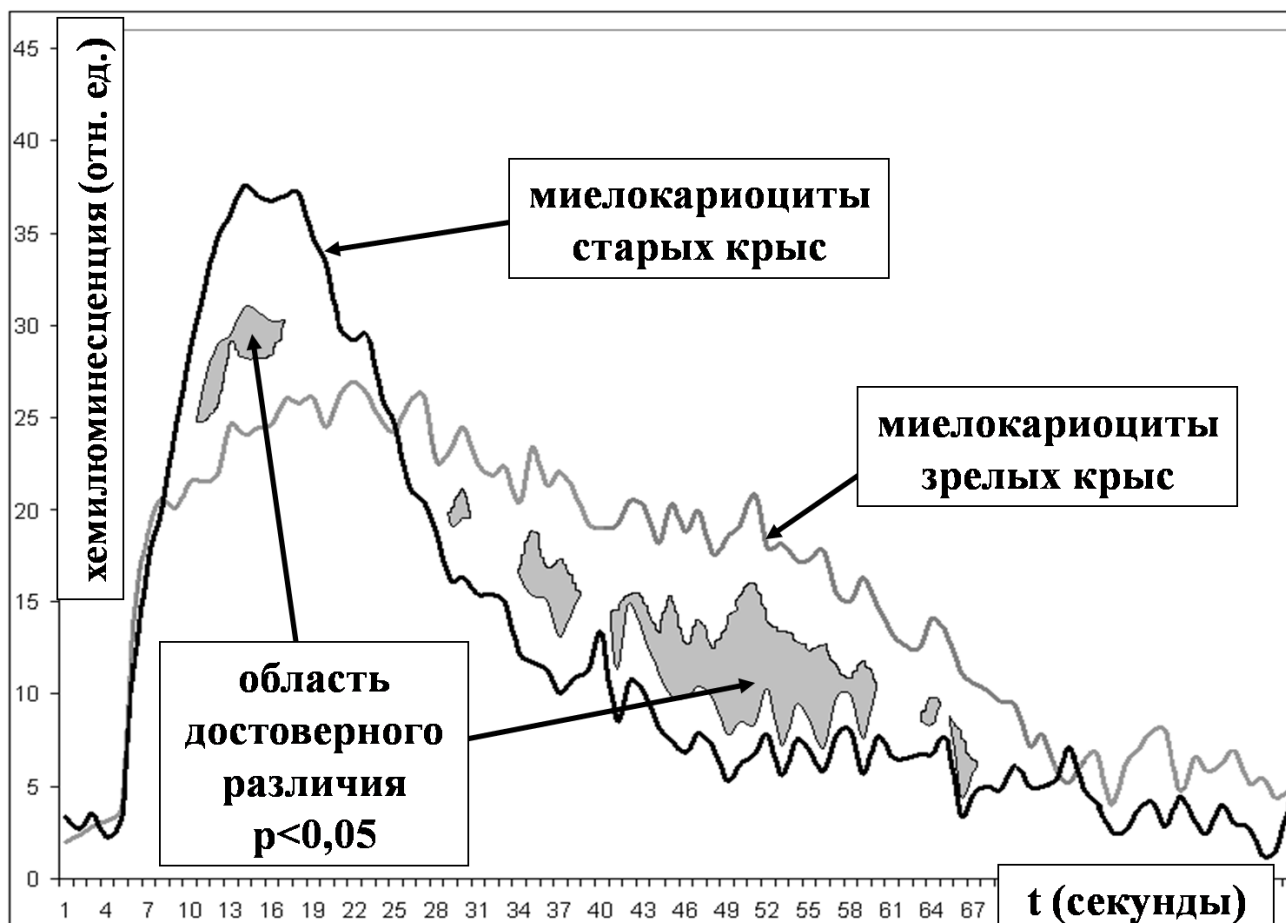


Рисунок 24 – Сравнительная хемилуминограмма (без индуцирования перекисью водорода) миелокариocyтов зрелых и старых крыс при инкубации с адреналином *in vitro*

Вторая причина – это свечение, вызванное каскадом биохимических реакций инициируемых адреналином и происходящих в сочетании с

фотохимическими проявлениями. Большинство этих реакций связано с фосфорилированием и дефосфорилированием макроэргических связей. Скорее всего, в ходе этих реакций и выделяется некоторого количества квантов света, которые могут вызывать значительное увеличение хемилюминесценции.

На графике видно (рисунок 24), что свечение вызванное адреналином в миелокариоцитах старых крыс, особенно в начале хемилюминесцентного анализа, достоверно превышает аналогичное свечение клеток зрелых крыс.

Во-первых – в миелокариоцитах старых крыс может быть повышенное содержание легкоокисляемых субстратов, приводящих к большей активации процессов ПОЛ, по сравнению со зрелыми крысами.

Во-вторых – большее свечение миелокариоцитов старых крыс под влиянием адреналина, может свидетельствовать о нарушении с возрастом передачи сигнала от гормона (нейромедиатора) в клетку. Возможно, что в механизм передачи сигнала от рецептора в клетку, могут вовлекаются посторонние химические реакции с катаболической направленностью, что связано с возраст-зависимым снижением качества функционирования адренорецепторов.

В-третьих – с миелокариоцитах старых крыс уменьшается активность ряда ферментов участвующих в передаче и преобразовании сигнала от гормона (нейромедиатора) в клетку. Одним из таких ключевых ферментов может быть фосфодиэстераза (ФДЭ). Вследствие уменьшения активности ФДЭ, количество цАМФ или цГМФ внутриклеточных посредников между гормоном (нейромедиатором) и клеткой не уменьшается так быстро, как в клетках зрелых крыс. Так как цАМФ участвует во многих реакциях фосфорилирования, дефосфорилирования и активации ферментов, то можно предположить, что повышенное его количество в миелокариоцитах старых крыс будет сильнее вызывать свечение в этих клетках при воздействии на них адреналином.

4.2.2 - Изменение перекисного окисления липидов в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при инкубации с ацетилхолином *in vitro*

Внесение ацетилхолина в инкубационную среду с миелокариоцитами зрелых и старых крыс привело к увеличению интенсивности процессов ПОЛ в

этой среде, максимальное увеличение показателя КПОЛ происходило через 10 секунд с момента внесения ацетилхолина. В миелокариоцитах зрелых крыс величина КПОЛ увеличилась на 47% ($p<0,05$), в миелокариоцитах старых крыс – увеличилась на 37,4% ($p<0,05$), по сравнению с контролем (таблица 15).

Таблица 15 – Динамика величины коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ %) в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при инкубации с ацетилхолином in vitro

Группы Время (с)	Старые	Зрелые
контроль	91,4 ±14,4	108,6 ±10,5
5	127,0 ±11,5*	126,4 ±10,2
10	128,8 ±10,9*	155,6 ±2,2* **
20	120,4 ±13,4*	146,4 ±7,1* **
40	122,6 ±11,9 *	133,5 ±12,9*
60	128,2 ±11,1*	133,8 ±3,3*
180	97,4 ±7,4	105,7 ±12,6
600	98,4 ±8,1	99,8 ±13,8
1800	102,5 ±9,5	108,2 ±18,3
3600	96,1 ±5,5	116,6 ±7,2**
5400	85,5 ±10,9	109,5 ±13,7
7200	104,9 ±5,9	126,9 ±8,8**

Примечание: * $p<0,05$ при сравнении с контролем (0 секунд);
** $p<0,05$ при сравнении со старыми крысами.

Известно, что в клетках крови (эритроциты, нейтрофилы, лимфоциты, тканевые базофилы) имеются внесинаптические мускариновые холинорецепторы (М-ХР), взаимодействующие с ацетилхолином, (их типы пока окончательно не идентифицированы) [35, 62, 96, 205, 247]. Увеличение значений КПОЛ при влиянии ацетилхолина происходит вследствие специфических внутриклеточных реакций вызванных этим нейромедиатором. В первую очередь, это связано с катаболическим влиянием на мембраны клетки, в ходе которых значительно увеличивается количества субстрата для протекания свободно–радикальных процессов.

Существует несколько механизмов передачи влияния ацетилхолина на клетку, чаще всего это заканчивается изменением концентрации внутриклеточного кальция. Заслуживает интерес механизм, изменяющий физико-химические свойства мембран клетки, в который вовлечены мускариновые холинорецепторы (М-ХР2, М-ХР3). Ацетилхолин опосредованно

через М-ХР, находящийся на мембране клетки активирует специфический Gi белок, который непосредственно стимулирует внутриклеточную фосфолипазу С, которая впоследствии гидролизует фосфолипиды мембраны с выходом легкоокисляемых продуктов (диацилглицериды, неэстерифицированные жирные кислоты и т.д.) индуцирующих активацию ПОЛ.

Спустя 3 минуты от начала эксперимента (180 секунд после введения ацетилхолина) уровень ПОЛ в миелокариocyтах зрелых и старых крыс приходит к норме (таблица 15, рисунок 25). Понижением величины КПОЛ в миелокариocyтах крыс могли являться две причины.

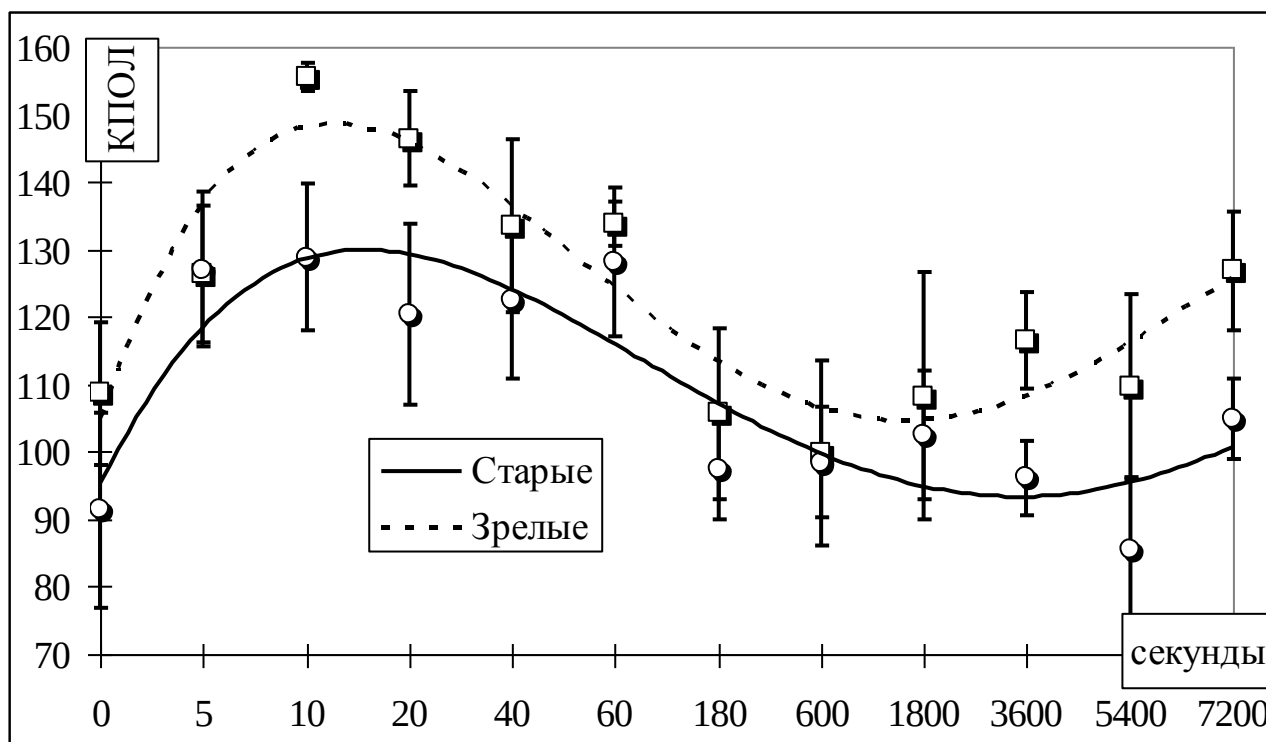


Рисунок 25 – Изменение величины коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) в миелокариocyтах зрелых и старых крыс при инкубации с адреналином *in vitro*

Во-первых, могло происходить уменьшение количества ацетилхолина под действием фермента холинэстеразы: - так как на миелокариocyтах присутствуют внесинаптические мускариновые холинорецепторы, то должен присутствовать фермент холинэстераза гидролизующий ацетилхолин. В противном случае, полученное в эксперименте уменьшение КПОЛ в миелокариocyтах происходило бы не через 3 минуты, а на первых секундах эксперимента.

Во-вторых, вследствие протекания свободно-радикальных реакций,

количество легкоокисляемого субстрата (ди- и моноацилглицерды, неэстерифицированные жирные кислоты, простагландины и т.д.) уменьшается и следовательно, активность процессов ПОЛ также будет уменьшаться.

В течение последующего часа эксперимента (3600 секунд) заметных изменений в КПОЛ не наблюдалось, но начиная со второго часа инкубации и далее, наблюдается тенденция к увеличению величины КПОЛ в миелокариocyтах зрелых и старых крыс (таблица 15, рисунок 25). Причем в миелокариocyтах зрелых крыс в течение 1 часа (3600 секунд) эксперимента КПОЛ увеличился на 20,5% ($p < 0,05$), а через 2 часа (7200 секунд) на 22,0% ($p < 0,05$), по сравнению со старыми крысами. Возможной причиной такого увеличения КПОЛ на поздних сроках эксперимента, могла являться гибель клеток в инкубационной среде.

При сравнении динамики ПОЛ в миелокариocyтах зрелых и старых крыс можно увидеть, что в клетках зрелых крыс величина КПОЛ была выше, чем в клетках старых крыс (рисунок 25). На протяжении всего эксперимента с инкубацией миелокариocyтов в присутствии ацетилхолина, уровень ПОЛ в клетках зрелых крыс выше на 14% ($p > 0,05$) по сравнению с миелокариocyтами старых крыс. Описанные различия можно объяснить тремя причинами.

Во-первых, в миелокариocyтах зрелых крыс количество и качество внесинаптических холинорецепторов должно преобладать по сравнению с миелокариocyтами старых крыс. Как было отмечено выше, работа холинорецепторов сопровождается увеличением интенсивности процессов ПОЛ, следовательно, чем больше рецепторов, тем выше ПОЛ. В доказательство этого можно отметить, что на 10 и 20 секундах после добавления ацетилхолина, когда ПОЛ достигает максимума, в миелокариocyтах зрелых крыс величина КПОЛ была выше на 26,6% ($p < 0,05$), чем в миелокариocyтах старых крыс (таблица 15, рисунок 25).

Во-вторых, у старых крыс как было отмечено выше, в кроветворном микроокружении костного мозга преобладает липидная фракция с повышенным содержанием липидов слабовосприимчивых к перекисному окислению (холестерин, насыщенные жирные кислоты), которые в данном

случае выполняют функцию структурных антиоксидантов, то есть своим непосредственным нахождением в месте повышенного перекисного окисления они препятствуют распространению свободных радикалов. Другими словами в миелокариocyтах старых крыс более высокая общая АОА, и это достигается тем, что с возрастом миелокариocyтах происходит увеличение доли структурных неферментативных антиоксидантов.

В-третьих, в миелокариocyтах зрелых крыс интенсивность пролиферации выше, чем в миелокариocyтах старых крыс, не исключено, что увеличенная клеточная пролиферация, может сопровождается более высокими значениями КПОЛ, что и наблюдалось.



Рисунок 26 – Сравнительная хемилуминограмма (без индуцирования перекисью водорода) миелокариocyтов зрелых и старых крыс при инкубации с ацетилхолином *in vitro*

Введение ацетилхолина в инкубационную среду с миелокариocyтами (без инициализации перекисью водорода) привело к многократному увеличению свечения при хемилуминесцентном анализе (рисунок 26). Максимальное увеличение свечения у зрелых крыс наблюдалось на 17 секунде после введения ацетилхолина, (свечение увеличилось в 19 раз) у старых крыс на 15 секунде

(свечение увеличилось в 12 раз).

Подобное увеличение свечения, возможно, было вызвано двумя причинами. Первая причина – это свечение, связанное с увеличением интенсивности ПОЛ в результате действия ацетилхолина (рисунок 26). Ацетилхолин увеличивает в мембране и примембранном пространстве клеток количество легкоокисляемого субстрата для процессов ПОЛ, в результате чего интенсивность ПОЛ возрастает.

Вторая причина – ацетилхолин внутри клетки активировал фосфолипазы и протеинкиназы, которые в основном катализируют кatabолические реакции связанные с распадом ковалентных связей (фосфорилирования, дефосфорилирования и т.д.). Скорее всего, в ходе этих реакций и происходит выделение некоторого количества квантов света, которые и вызывают в эксперименте увеличение свечения при хемилюминесцентном анализе.

На графике видно (рисунок 26), что свечение, вызванное ацетилхолином в миелокариocyтах зрелых крыс, особенно в первые 30 секунд хемилюминесцентного анализа, достоверно превышал аналогичное свечение в миелокариocyтах старых крыс. В предыдущей главе, в случае с адреналином ситуация обратная, на первых секундах реакции свечение выше в миелокариocyтах старых крыс, по сравнению со зрелыми крысами.

Таким образом, в заключение к данной главе можно отметить, что воздействие и адреналина и ацетилхолина на крыс зрелого и старого возраста приводило к увеличению величины интегрального показателя перекисного окисления липидов (ПОЛ) в системе крови. При этом адреналин способствовал быстрому и более значимому увеличению ПОЛ, а ацетилхолин – более продолжительному, но менее значимому по величине изменению этого показателя. В миелокариocyтах и межклеточной среде костного мозга прооксидантный эффект от введения нейромедиаторов (адреналин, ацетилхолин) проявлялся более выражено, чем в периферической крови, что могло быть связано с наличием в костном мозге большего числа акцепторов этих нейромедиаторов. Воздействие адреналина при иммобилизационном стрессе увеличивало в системе крови скорость изменения процессов

перекисного окисления липидов и антиокислительной активности (АОА), а воздействие ацетилхолина - замедляло скорость этих процессов.

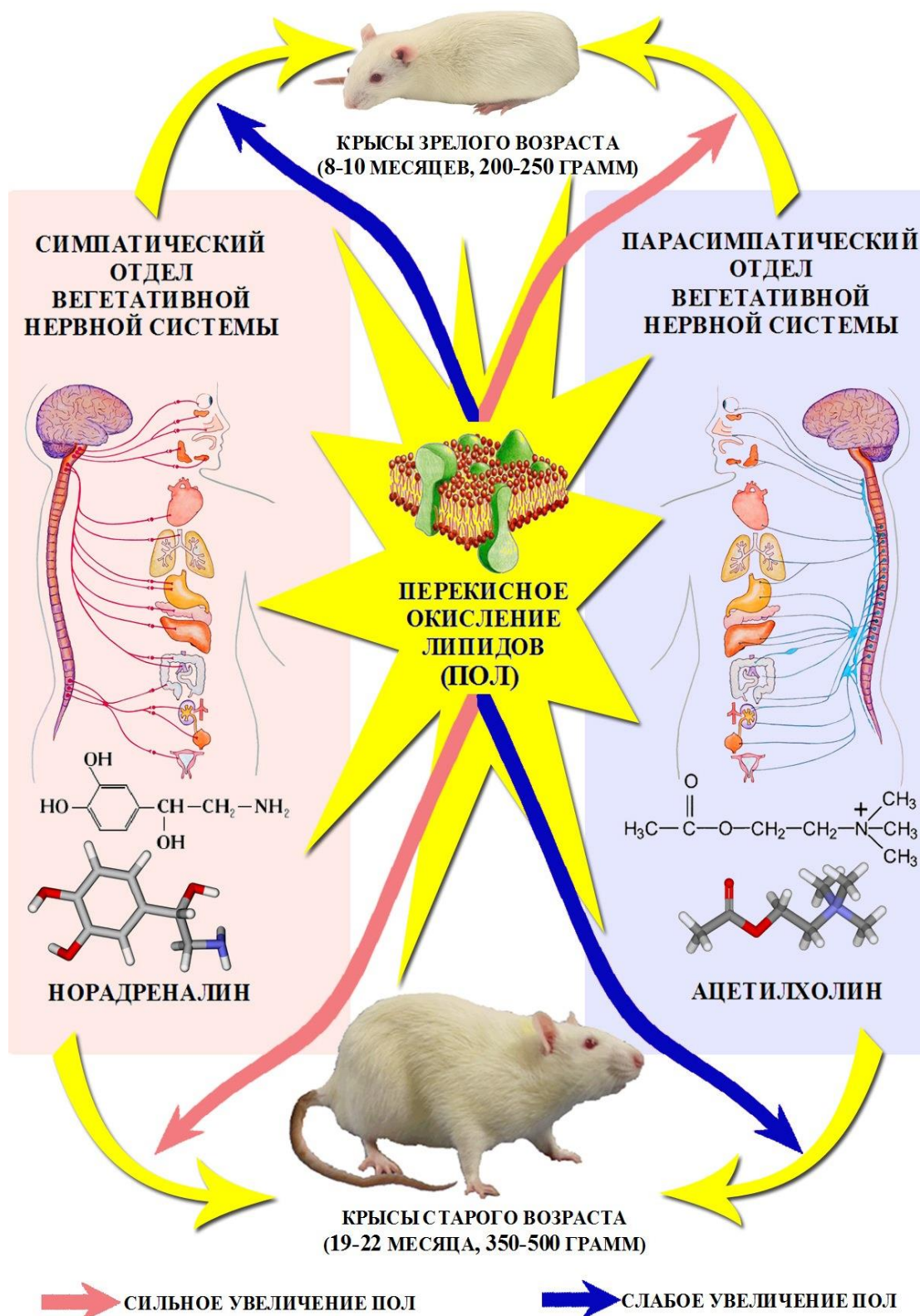


Рисунок 27 – Возрастные особенности участия симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы в изменении интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) системы крови крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

С увеличением возраста в системе крови старых крыс происходило уменьшение влияния адреналина и ацетилхолина на изменения интенсивности процессов ПОЛ и АОО. В миелокариocyтах старых крыс уменьшалось влияние парасимпатической нервной системы и увеличивалось влияние симпатической нервной системы на активацию процессов ПОЛ, что можно связать с возраст-зависимым уменьшением количества холинорецепторов и дисфункцией адренорецепторов клеток. Адреналин в большей степени увеличивал интенсивность процессов ПОЛ в миелокариocyтах старых крыс, а ацетилхолин - в миелокариocyтах зрелых крыс, что могло быть одним из механизмов, приводящих к снижению пролиферативного потенциала костного мозга при старении (рисунок 27).

ГЛАВА 5 - ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАНИЯ L-ТРИПТОФАНА И НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ, АНТИОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ И ЛИПИДНО- ЛИПОПРОТЕИДНЫЙ СОСТАВ У ЗРЕЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕСС-ВОЗДЕЙСТВИИ

Незаменимая аминокислота L-триптофан (Trp) относится к группе индольных производных и благодаря этому она обладает антиоксидантными свойствами [118, 158]. Кроме того, сами производные Trp, такие как 5-гидрокси-L-триптофан и мелатонин широко известны и относятся к сильными антиоксидантам, превышающими по своей активности аскорбиновую кислоту и витамин Е [7, 26]. Известно, что никотиновая кислота (Н.к.) активно участвует в метаболизме Trp [222, 308, 317] и должна усиливать антиоксидантный эффект Trp (глава 1, рисунок 1). Также в литературе нет данных о возрастных различиях в антиоксидантных свойствах L-триптофана в сочетании с никотиновой кислотой (Trp+Н.к.). Поэтому изучение влияния Trp+Н.к. на ПОЛ и АОА у зрелых и старых крыс в нормальном состоянии и на фоне иммобилизационного стресс воздействия актуально.

Метаболические производные Trp по серотониновому пути обладают психотропными (антидепрессивными и снотворными) свойствами [200, 239, 240]. Наряду с этим известно, что психо-депрессивные состояния приводят к изменениям в системе ПОЛ/АОА и могут способствовать развитию атеросклероза, одного из основных возрастных заболеваний человека [83, 42]. Поэтому существует необходимость исследовать вопрос об антиоксидантном, гиполипидемическом и антидепрессивном действии Trp и Н.к. на крысах разного возраста в норме и при стрессе.

5.1 - Влияние совместного введения L-триптофана и никотиновой кислоты на процессы перекисного окисления липидов и антиокислительную активность в периферической крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

У интактных крыс с увеличением возраста уровень коэффициента антиокислительной активности (КАОА) в крови не изменялся. Воздействие

иммобилизации, как стресс-фактора, приводило к уменьшению КАОА в периферической крови зрелых и старых крыс. У старых крыс КАОА при иммобилизации в периферической крови уменьшался на 8% ($p>0,05$), у зрелых крыс КАОА - на 14% ($p<0,05$), (таблица 16), по сравнению с интактными крысами. Эти данные коррелируют с материалами, описанными в третьей главе диссертации (рисунок 8), где показано, что к 12 часу после иммобилизационного стресс-воздействия в начале стадии резистентности, также наблюдалось уменьшение величины КАОА. Уменьшение КАОА связано со снижением в ходе стресс-реакции количества неферментативных антиоксидантов и началом активации ферментативной составляющей АОС.

Таблица 16 – Изменение величины коэффициента антиокислительной активности (КАОА %) у зрелых и старых крыс в периферической крови при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Тгр+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	96±10	88±8	97±6(1)	83±7(1, 2)
Тгр+Н.к.	99±11	103±11	116±16	104±3(2)

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Введение Тгр+Н.к. зрелым и старым крысам привело к закономерному увеличению значений КАОА в периферической крови, у старых крыс КАОА увеличился на 3% ($p>0,05$), у зрелых крыс – КАОА на 19% ($p>0,05$), по сравнению с контролем.

Введение Тгр+Н.к. животным на фоне иммобилизационного воздействия приводило к значительному увеличению АОА в периферической крови. У старых крыс воздействие Тгр+Н.к. и последующая за этим иммобилизация вызвали увеличение КАОА в сыворотке крови на 17% ($p>0,05$), у зрелых крыс - на 25% ($p<0,05$). L-триптофан и его производные являются неферментативными антиоксидантами и поэтому введение L-триптофана крысам может создать дополнительный резерв в неферментативной АОС.

Исследование перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови интактных старых и зрелых крыс показало наличие лишь тенденции по уменьшению активности ПОЛ с возрастом. Воздействие иммобилизации как стресс-фактора

приводило к увеличению активности ПОЛ в крови зрелых и старых крыс. У старых крыс при иммобилизации уровень коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) в периферической крови увеличился на 2% ($p>0,05$), у зрелых крыс уровень КПОЛ увеличился на 20% ($p>0,05$), (таблица 17), что соответствует началу стадии резистентности (глава 3, рисунок 7). Уровень ПОЛ в периферической крови увеличился в результате истощения резерва неферментативной АОА, вызванного иммобилизацией. Введение Trp+Н.к. зрелым и старым крысам, как до иммобилизации, так и на фоне иммобилизации, приводило к снижению интенсивности процессов ПОЛ в периферической крови. У старых крыс в периферической крови величина КПОЛ уменьшилась на 6% ($p>0,05$), у зрелых крыс – на 11% ($p>0,05$), по сравнению с контролем. Выявленное уменьшение КПОЛ у всех групп крыс связано с антиоксидантным эффектом L-триптофана и его производных, количество которых при сочетании L-триптофана с никотиновой кислотой увеличивается.

Таблица 17 – Изменение величины коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ %) у зрелых и старых крыс в периферической крови при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	92±24	94±10(1)	108±22	130±12(1)
Trp+Н.к.	86±14	88±11	105±12	105±26

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Изучение процессов ПОЛ в эритроцитах крови интактных зрелых и старых крыс показало наличие тенденции по уменьшению активности ПОЛ с возрастом. Иммобилизационное воздействие на зрелых и старых крыс приводило к незначительной активации ПОЛ в эритроцитах крови. Стресс-воздействие вызвало некоторое повышение КПОЛ в эритроцитах старых крыс на 4% ($p>0,05$), у зрелых крыс КПОЛ эритроцитов увеличился на 8% ($p>0,05$) (таблица 18). Иммобилизация как экстремальный фактор привела к повышению ПОЛ в эритроцитах, демонстрируя прооксидантный эффект.

Таблица 18 – Изменение величины коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ %) у зрелых и старых крыс в эритроцитах крови при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Трп+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	91±4(1)	95±16	103±8(1)	111±26
Трп+Н.к.	91±19	94±15	92±9	97±5

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p < 0,05$).

Введение Трп+Н.к. зрелым крысам как до, так и во время иммобилизации, привело к проявлению тенденции антиоксидантного эффекта, выраженного в уменьшении КПОЛ эритроцитов крови на 12% ($p > 0,05$). Следует отметить, что воздействие Трп+Н.к. на эритроциты старых крыс даже не привело и к таким изменениям. Возможно влияние Трп+Н.к. на эритроциты зрелых и старых крыс происходило опосредованно через плазму крови, в результате чего наблюдалась низкая антиокислительная эффективность действия Трп+Н.к. на процессы ПОЛ в эритроцитах.

Таким образом, Трп+Н.к. оказывал на животных антиоксидантный эффект с увеличением значений КАОА в норме и при стрессе. Введение Трп+Н.к. могло создавать в крови крыс дополнительный резерв неферментативной АОС. Сравнение между зрелыми и старыми крысами показало, что с возрастом антиоксидантное влияние Трп+Н.к. на АОА в крови уменьшается. Известно, что с возрастом в процессе старения происходит снижение активности многих ферментных систем [5, 113]. Поэтому можно предположить, что снижение антиокислительной активности сочетания Трп+Н.к. в крови старых крыс, связано с возраст-зависимым снижением активности ферментных комплексов, принимающих участие в метаболизме L-триптофана.

Воздействие Трп+Н.к. уменьшало или приводило к норме значения КПОЛ в контрольных и опытных группах животных. В эритроцитах антиоксидантный эффект наблюдался не от прямого действия Трп+Н.к., а опосредованно через изменения, произошедшие в плазме крови. Изучение ПОЛ в периферической крови и эритроцитах подтвердило данные, об антиоксидантном действии сочетания Трп+Н.к. на зрелых и старых крыс.

5.2 - Влияние совместного введения L-триптофана и никотиновой кислоты на процессы перекисного окисления липидов и антиокислительную активность в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

У интактных крыс до иммобилизации уровень коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) в миелокариоцитах с возрастом не изменялся. Иммобилизационное стресс-воздействие вызывало увеличение КПОЛ в миелокариоцитах старых крыс на 21% ($p < 0,05$), у зрелых – на 43% ($p < 0,05$) (таблица 19). Это соответствует началу фазы резистентности с инициацией механизмов адаптации, связанных с увеличением синтеза антиокислительных ферментов и началом уменьшения ПОЛ (глава 3, рисунок 12).

Таблица 19 – Изменение величины коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ %) в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	98±21	119±13	100±8	143±14(1)
Trp+Н.к.	85±7	102±16	94±15	95±14 (1)

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p < 0,05$).

Введение Trp+Н.к. привело к понижению КПОЛ в миелокариоцитах интактной группы старых крыс на 13% ($p > 0,05$), в группе с иммобилизацией – на 14% ($p > 0,05$). Воздействие Trp+Н.к. на интактных и иммобилизованных зрелых крыс, также приводило к нормализации, а затем к дальнейшему уменьшению показателей КПОЛ в миелокариоцитах. У зрелых интактных крыс уровень КПОЛ в миелокариоцитах понизился на 6% ($p > 0,05$), после иммобилизации уровень КПОЛ уменьшился на 33 % ($p > 0,05$) (таблица 19). Эти данные характеризуют Trp+Н.к. как эффективный антиоксидант, нормализующий уровень ПОЛ в миелокариоцитах костного мозга в нормальных условиях и при экстремальном воздействии. При анализе возрастных различий в изменениях величины КПОЛ миелокариоцитов между зрелыми и старыми крысами, были получены данные, демонстрирующие

выраженное влияние Trp+Н.к. на ПОЛ миелокариоцитов зрелых крыс. В данном случае можно провести аналогию с периферической кровью, где влияние Trp+Н.к. на ингибирование процессов ПОЛ у зрелых крыс было более значимо, чем у старых крыс (таблица 17,18). Возможно, обнаруженные различия между зрелыми и старыми животными связаны с изменениями или нарушениями в метаболизме L-триптофана, происходящими при старении.

У интактных крыс до иммобилизации уровень КАОА в миелокариоцитах с возрастом не изменялся. При иммобилизации в миелокариоцитах зрелых и старых крыс произошло уменьшение значений КАОА, у старых крыс уровень КАОА уменьшился на 17% ($p>0,05$), у зрелых крыс - на 30% ($p<0,05$) (таблица 20), по сравнению с интактными крысами. Эти данные соответствуют началу фазы резистентности стресса или 12 часам после иммобилизационного стресс-воздействия; на данном этапе запускаются механизмы долгосрочной адаптации в виде начала синтеза ферментов АОС (глава 3, рисунок 20).

Таблица 20—Изменение величины коэффициента антиокислительной активности (КАОА %) в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	91±8(1)	63±9(2,1)	89±14	74±12(4)
Trp+Н.к.	115±28	114±12(2,3)	94±13(5)	158±27(3,4,5)

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Воздействие Trp+Н.к., как неферментативного антиоксиданта группы индольных производных, закономерно приводило к увеличению неферментативной АОА в миелокариоцитах зрелых и старых крыс. Воздействие Trp+Н.к. зрелых крыс вызвало увеличение значения КАОА в миелокариоцитах на 6% ($p>0,05$), аналогичное воздействие на старых крыс увеличило КАОА на 26% ($p>0,05$) (таблица 20), по сравнению с контролем.

Введение Trp+Н.к. животным разного возраста и последующее за этим экстремальное воздействие значительно увеличило КАОА в миелокариоцитах крыс. У старых крыс введение Trp+Н.к. и последующая иммобилизация

увеличили КАОА в миелокариоцитах на 80% ($p<0,05$), у зрелых крыс - на 113% ($p<0,05$) (таблица 20). В данном случае Trp+Н.к. показал антиоксидантные свойства на костный мозг зрелых и старых крыс в норме и при иммобилизационном стресс-воздействии.

При изучении возрастных различий было выявлено, что Trp+Н.к. в большей степени увеличивал КАОА в миелокариоцитах зрелых крыс. КАОА в миелокариоцитах зрелых крыс после введения Trp+Н.к. и последующей иммобилизации был больше на 39% ($p<0,05$) (таблица 20), по сравнению со старыми крысами в аналогичных условиях.

Иммобилизационное стресс-воздействие у зрелых и старых крыс вызвало уменьшение активности каталазы в миелокариоцитах костного мозга. У старых крыс после иммобилизации активность каталазы в миелокариоцитах уменьшилась на 23% ($p<0,05$), у зрелых крыс - на 10% ($p<0,05$) (таблица 21), по сравнению с интактными животными. Введение Trp+Н.к. зрелым и старым крысам до иммобилизации не привело к увеличению активности каталазы в костном мозге. Воздействие Trp+Н.к. на фоне иммобилизации также не показало заметного увеличения активности каталазы в костном мозге зрелых и старых крыс (таблица 21).

Таблица 21 – Активность каталазы (мккат/мг. белка) в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	4,05±1,46	3,10±0,71	2,17±0,25	1,96±0,54
Trp+Н.к.	3,82±0,25	3,14±0,64	2,21±0,42	2,09±0,55

При изучении данных по неферментативной АОА были получены результаты, позволяющие утверждать, что влияние Trp+Н.к. на АОА миелокариоцитов костного мозга заключается в увеличении неферментативной составляющей АОС.

Воздействие Trp+Н.к. на зрелых и старых крыс, до и после иммобилизации приводило к увеличению неферментативной АОА в миелокариоцитах. У старых крыс как до, так и во время иммобилизации

Trp+H.k. увеличивал неферментативную АОА в миелокариоцитах на 52% ($p<0,05$), у зрелых крыс - 63% ($p<0,05$) (таблица 22), по сравнению с контролем. Trp+H.k. оказывал выраженный антиоксидантный эффект на миелокариоциты костного мозга зрелых и старых крыс, в 1,5 раза увеличивая силу неферментативной АОА.

Таблица 22 – Изменение общей неферментативной антиокислительной активности (ОАА %/мг. белка) в миелокариоцитах зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+H.k.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	20±2(1,2)	25±2(2,4,5)	21±5(7)	19±2(4,8)
Trp+H.k.	29±5(1,3)	40±3(3,5,6)	33±2(7)	32±3(6,8)

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Таким образом, воздействие Trp+H.k. на зрелых и старых крыс приводило к однозначному антиоксидантному эффекту в миелокариоцитах костного мозга. Trp+H.k. уменьшал уровень КПОЛ в миелокариоцитах при нормальных условиях и нормализовал уровень ПОЛ при иммобилизационном стресс–воздействии. При анализе возрастных различий в изменениях КПОЛ миелокариоцитов между зрелыми и старыми крысами были получены данные, демонстрирующие более выраженный антиоксидантный эффект Trp+H.k. на миелокариоциты зрелых крыс. Возможно, что обнаруженные различия между зрелыми и старыми крысами, связаны с изменениями или нарушениями в метаболизме L-триптофана, происходящие при старении.

Таким образом, при изучении АОА в миелокариоцитах зрелых и старых крыс, было определено, что Trp+H.k. проявлял сильное антиокислительное действие, как неферментативный антиоксидант. То есть, как до иммобилизации, так и во время иммобилизации Trp+H.k. достоверно в 1,5 раза увеличивал уровень общей неферментативной АОА в миелокариоцитах зрелых и старых крыс. При изучении действия Trp+H.k. на ферментативную часть АОС изменений обнаружено не было, Trp+H.k. не влиял на активность ферментов.

5.3 - Влияние совместного введения L-триптофана и никотиновой кислоты на процессы перекисного окисления липидов и антиокислительной активности в головном мозге зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии

У зрелых и старых интактных крыс уровень коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) в головном мозге не отличался. После иммобилизационного стресс-воздействия значение КПОЛ в головном мозге старых крыс увеличилось на 13% ($p>0,05$), проявился прооксидантный эффект иммобилизации. Однако, введение сочетания Тгр+Н.к. на фоне стресс-воздействия привело к стойкому понижению КПОЛ на 31% ($p<0,05$), что говорит об антиоксидантном влиянии Тгр+Н.к. на головной мозг старых крыс (таблица 23).

Таблица 23 – Изменение величины коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ %) в головном мозге зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Тгр+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	105±34	118±22(1)	105±14	113±25(2)
Тгр+Н.к.	103±17	87±6(1)	104±13	69±20(2)

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Воздействие сочетания Тгр+Н.к. на группу зрелых крыс после иммобилизационного стресс-воздействия также привело к уменьшению КПОЛ на 35% ($p>0,05$). Следует отметить, что введение Тгр+Н.к. интактным группам зрелых и старых крыс не вызывало значимого изменения КПОЛ в головном мозге (таблица 23).

Изменения активности фермента ФЛА₂ и величина КПОЛ головного мозга зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии находились между собой в прямой зависимости. Повышение активности ФЛА₂ приводило к аналогичным изменениям КПОЛ в головном мозге зрелых и старых крыс (таблица 24), особенно в группах после иммобилизационного стресс-воздействия. Воздействие сочетания Тгр+Н.к. на старых крысах при

иммобилизационном стресс–воздействии приводило к снижению активности ФЛА₂ на 14% ($p>0,05$), у зрелых крыс - на 46% ($p<0,05$). Уменьшая активность ФЛА₂, сочетание Trp+Н.к. тем самым блокировало образование свободных жирных кислот и уменьшало интенсивность процессов ПОЛ.

Таблица 24 – Изменение активности фосфолипазы А₂ (нкат/мг белка) в головном мозге зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	0,37±0,23(1)	0,81±0,14(1,2)	0,54±0,08(4)	0,50±0,15(2,6)
Trp+Н.к.	0,74±0,24	0,73±0,40(3)	0,80±0,17(4,5)	0,23±0,06(3,5,6)

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Таким образом, в головном мозге крыс при стресс-воздействии сочетание Trp+Н.к. проявляло себя как антиоксидант, понижающее уровень ПОЛ и активность фермента ФЛА₂ в обеих возрастных группах.

При изучении коэффициента антиокислительной активности (КАОА) в головном мозге крыс выявились другие закономерности, по сравнению с изменениями КПОЛ: выявлены различия между крысами зрелого и старого возраста. В головном мозге интактных старых крыс величина КАОА была меньше на 8% ($p>0,05$), что показывает тенденцию к снижению АОА в головном мозге с возрастом (таблица 25).

Изменения КАОА в головном мозге зрелых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии находились в прямой зависимости от изменений КПОЛ, то есть изменения КПОЛ, вызванные иммобилизацией влекли за собой синхронные изменения КАОА (таблица 23,25). Таким образом, можно предположить, что АОС в головном мозге зрелых крыс активно реагирует на изменения ПОЛ, что возможно связано с работой антиокислительных ферментов и в частности каталазы. И действительно, активность каталазы (таблица 26) у всех зрелых групп крыс прошедших иммобилизацию, в среднем выше, чем у старых крыс на 32% ($p>0,05$). Применение сочетания Trp+Н.к. приводило к увеличению активности каталазы

и КАОА у всех исследуемых групп зрелых крыс, Trp+Н.к. проявлял себя как потенциальный антиоксидант.

Таблица 25 – Изменение величины коэффициента антиокислительной активности (КАОА %) в головном мозге зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	87±18	76±14(1,2)	95±14(3)	145±34(1,3)
Trp+Н.к.	94±29	106±14(2)	135±65	86±28

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p < 0,05$).

Таблица 26 – Изменение активности каталазы (мккат/мг белка) в головном мозге зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	0,65±0,19	0,50±0,18	0,60±0,16	0,92±0,45
Trp+Н.к.	0,66±0,29	0,63±0,08	1,14±0,88	0,74±0,41

При сравнении динамики КАОА с динамикой КПОЛ в головном мозге у старых крыс при иммобилизации обнаруживается обратная зависимость между этими параметрами (таблица 23,25) В результате иммобилизационного стресс–воздействия в головном мозге старых крыс активируется ФЛА₂ и как следствие увеличивается активность ПОЛ, но увеличения АОА не наблюдается. Возможно, это связано с возрастным уменьшением эффективности действия ферментативной АОА. Благодаря чему в головном мозге старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии основная нагрузка по антиокислительной защите осуществляется за счет неферментативных антиоксидантов.

При изучении неферментативной АОА в головном мозге между старыми и зрелыми крысами было обнаружено, что общая антиокислительная активность (ОАА) во всех исследуемых группах старых крыс в среднем меньше на 23,5% по сравнению со зрелыми крысами, в некоторых случаях достоверно (таблица 27).

Таблица 27 – Изменение общей неферментативной антиокислительной активности (ОАА %/мг белка) в головном мозге зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	3,31±2,33	3,48±1,08(2)	5,96±0,98	6,26±1,37(2,3)
Trp+Н.к.	3,17±1,20(1)	5,83±1,43	4,20±1,32(1)	3,57±1,07(3)

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p < 0,05$).

В заключение можно сделать вывод, что наиболее сильное влияние Trp+Н.к. оказывал на центральную нервную систему зрелых и старых крыс. Введение сочетания Trp+Н.к. приводило к выраженному антиоксидантному эффекту на головной мозг зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии. В обеих возрастных группах в норме и при иммобилизации Trp+Н.к. понижал величину КПОЛ и повышал антиокислительную активность, у старых крыс усиливалась неферментативная АОА, у зрелых крыс – активность каталазы.

5.4 - Влияние совместного введения L-триптофана и никотиновой кислоты на процессы перекисного окисления липидов и антиокислительной активности в печени зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии

Так как в печени проходят основные метаболические пути и, в частности, пути анаболизма и катаболизма аминокислот, то следует предположить что наиболее сильный антиоксидантный эффект продуктов метаболизма L-триптофана (индолов) будет наблюдаться в печени, где они собственно и образуются.

Таблица 28 – Изменения величины коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ %) в печени зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	104±21	114±23	106±25	112±30
Trp+Н.к.	94±18	113±28	70±12	81±11

У интактных крыс до иммобилизации величина коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) в печени с возрастом не изменялся (таблица 28). Иммобилизация вызывала заметную тенденцию по активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени крыс разного возраста, у крыс старого возраста КПОЛ увеличился на 10 - 20% ($p>0,05$), у крыс зрелого возраста - на 6-11% ($p>0,05$).

Обнаруженное увеличение КПОЛ может быть связано с активацией фермента фосфолипаза А₂ (ФЛА₂). Активность фермента ФЛА₂ у старых крыс в печени после стресс-воздействия увеличилась на 21% ($p<0,05$), у зрелых крыс - на 39% ($p>0,05$) (таблица 29).

Таблица 29 – Изменение активности фосфолипазы А₂ (нкат/мг белка) в печени зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	0,33±0,02(1,2)	0,44±0,06(2)	0,49±0,05(1)	0,58±0,31
Trp+Н.к.	0,39±0,07	0,50±0,37	0,58±0,17	0,90±0,18

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Введение в организм животных разного возраста сочетания Trp+Н.к. приводило к уменьшению КПОЛ, у старых крыс КПОЛ понизился на 1-8% ($p>0,05$), у зрелых крыс на 31-36% ($p>0,05$) (таблица 28). То есть, Trp+Н.к. в печени животных разного возраста, как до иммобилизации, так и на фоне иммобилизации показывал преимущественно антиоксидантные свойства, уменьшая интенсивность процессов ПОЛ. При этом эффективность антиоксидантного воздействия сочетания Trp+Н.к. на печень крыс зрелого возраста была выраженной, чем на печень крыс старого возраста.

При изучении антиокислительной активности (АОА) выявились несколько иные закономерности, чем при изучении ПОЛ, в данном случае были обнаружены возрастные различия между старыми и зрелыми крысами. В печени интактных старых крыс было обнаружено уменьшение величина КАОА на 48% ($p<0,05$), что может быть прямым следствием возраст-зависимой деградации антиокислительной системы (АОС) печени у старых крыс (таблица

30). Введение сочетания Trp+Н.к. старым крысам вызвало увеличение КАОА в печени, что дополнительно может подтверждать его антиоксидантный характер. Введение Trp+Н.к. группе старых крыс до иммобилизации увеличило значение КАОА в печени на 59% ($p<0,05$), после иммобилизационного стресс-воздействия увеличение составило 46% ($p>0,05$), по сравнению с контрольными крысами.

Таблица 30 Изменение величины коэффициента антиокислительной активности (КАОА %) в печени зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	63±22(1,2)	72±16(3,4)	121±25(2)	147±42(3,5)
Trp+Н.к.	122±16(1)	118±44(4)	110±32	71±9(5)

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

В данном случае увеличение АОА могло произойти за счет активации как ферментативной, так и неферментативной АОС. К примеру, активность каталазы печени, как одного из показательных антиокислительных ферментов, после введения Trp+Н.к. старым интактным крысам увеличилась на 70,5% ($p<0,05$), а после иммобилизации увеличилась на 37,6% ($p>0,05$) (таблица 31).

Таблица 31 – Изменение активности каталазы (мккат/мг белка) в печени зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	3,65±1,72(1,2)	5,16±1,47	8,69±3,00(2)	8,90±3,60
Trp+Н.к.	8,30±1,65(1)	7,64±4,50	5,63±1,88	4,78±0,91

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Введения Trp+Н.к. старым крысам также привело к увеличению в печени неферментативной АОА, в группе старых крыс до стресс-воздействия произошло увеличение КАОА на 30% ($p>0,05$), в группе после иммобилизации на 104% ($p>0,05$), по сравнению с контролем (таблица 32). У зрелых крыс выявилась противоположная закономерность, после введения Trp+Н.к. зрелым

крысам произошло не увеличение, а понижение значения КАОА, но это не означает что сочетание Тгр+Н.к. в печени у зрелых животных свою функцию как антиоксидант не выполняет. КАОА в печени зрелых крыс после введения Тгр+Н.к. до иммобилизационного стресс-воздействия уменьшился на 11% ($p>0,05$), после стресс-воздействия уменьшился на 71% ($p<0,05$) (таблица 30).

Таблица 32 – Изменение общей неферментативной антиокислительной активности (ОАА%/мг белка) в печени зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Тгр+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	4,29±1,87	2,20±1,71(1)	5,41±1,98	7,07±1,07(1,2)
Тгр+Н.к.	5,87±0,66	7,73±4,29	5,25±1,92	4,37±0,70(2)

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Таким образом, сочетание Тгр+Н.к. оказывало преимущественно антиоксидантный эффект на печень животных как до иммобилизации, так и на фоне иммобилизационного стресс–воздействия. Особенно заметное влияние Тгр+Н.к. оказал на печень старых крыс, введение Тгр+Н.к. приводило у этой группы к заметному уменьшению ПОЛ и росту активности антиокислительной системы.

5.5 - Влияние сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты на изменение липидного и липопротеидного состава крови у зрелых и старых крыс в норме и при иммобилизационном стресс–воздействии

В связи с тем что, сочетание L-триптофана и никотиновой кислоты (Тгр+Н.к.) обладает заметным антиоксидантным эффектом, можно предположить, что оно положительно влияет на липидный и липопротеидный состав крови.

При изучении количества общих липидов (ОЛ) в сыворотке крови у зрелых и старых крыс, была обнаружена тенденция к уменьшению их количества с возрастом на 16% ($p>0,05$). При иммобилизационном стресс-воздействии количество ОЛ в сыворотке крови старых крыс не менялось, у зрелых крыс стресс-воздействие привело к понижению уровня липидов на

20,5% ($p < 0,05$). Введение сочетания Trp+Н.к. крысам разного возраста до иммобилизации приводило к уменьшению уровня ОЛ в крови; у старых крыс он снизился на 5,5% ($p > 0,05$), у зрелых – на 11,5% ($p > 0,05$), по сравнению с интактными крысами. Воздействие Trp+Н.к. на фоне иммобилизационного стресс-воздействия не приводило к значимым изменениям количества ОЛ в сыворотке крови крыс (таблица 33).

Таблица 33–Изменение количества общих липидов (г/л) в сыворотке крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	4,23±0,90	4,36±0,80	5,02±0,26(1)	4,12±0,53(1)
Trp+Н.к.	3,99±0,31	4,66±0,54	4,51±0,38	4,17±0,45

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p < 0,05$).

Таким образом, Trp+Н.к. не оказывал существенного влияния на количество ОЛ в периферической крови у зрелых и старых животных. В контрольной группе зрелых и старых крыс при воздействии Trp+Н.к. наблюдалась тенденция по уменьшению уровня ПОЛ. У зрелых крыс влияние Trp+Н.к. на ОЛ периферической крови было более значимо, чем у старых крыс.

Таблица 34 – Изменение количества триглицеридов (ммоль/л) в крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	2,27±0,20(1)	2,05±0,64	1,34±0,12(1,3)	1,89±0,19(3)
Trp+Н.к.	2,26±0,65(2)	2,62±0,23	1,15±0,16(2,4)	2,31±0,35(4)

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p < 0,05$).

При изучении уровня триглицеридов (ТГ) было выявлено, что в сыворотке крови интактных старых крыс их уровень в среднем больше на 50% ($p < 0,05$), чем у интактных зрелых крыс (таблица 34). Введение Trp+Н.к. крысам, приводило к понижению в сыворотке крови крыс количества ТГ, у старых крыс ТГ стало меньше на 0,5% ($p > 0,05$) у зрелых на 9,5% ($p > 0,05$). Иммобилизационное стресс-воздействие увеличивало количество ТГ в крови

зрелых крыс на 43% ($p<0,05$). Введение сочетания Trp+Н.к. на фоне иммобилизации не привело уровень ТГ к норме. У старых крыс, воздействие сочетания Trp+Н.к. на фоне иммобилизации, увеличивало количество ТГ в крови на 29% ($p>0,05$), у зрелых крыс на 21% ($p>0,05$), по сравнению с интактными крысами. Воздействие Trp+Н.к. на крыс приводило к уменьшению количества ТГ в сыворотке крови и, особенно у зрелых крыс; при иммобилизационном стресс-воздействии Trp+Н.к. вызывал увеличение ТГ в сыворотке, особенно значимо у зрелых крыс.

У интактных крыс возрастных различий в количестве фосфолипидов (ФЛ) сыворотки крови обнаружено не было (таблица 35). Изучение ФЛ в сыворотке крови при иммобилизации показало тенденцию к уменьшению количества этих липидов, у старых и крыс количество ФЛ уменьшилось на 8% ($p>0,05$), у зрелых крыс изменений не произошло, по сравнению с интактными крысами.

Таблица 35 – Изменение количества фосфолипидов (мкмоль/л) в сыворотке крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	7,43±0,34	8,05±0,59(1)	7,20±0,53	7,18±0,41(2)
Trp+Н.к.	6,07±1,60	5,86±0,60(1)	5,77±1,64	5,66±1,24(2)

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Введение животным сочетания Trp+Н.к., как до иммобилизации, так и на фоне иммобилизации вызвало уменьшение количества ФЛ в сыворотке крови, причем у обеих возрастных групп, у старых крыс уровень ФЛ уменьшился на 22,7% ($p<0,05$), у зрелых крыс – на 20,5% ($p<0,05$) (таблица 35). Возможно, что обнаруженное уменьшение количества фосфолипидов в сыворотке крови на фоне введения сочетания Trp+Н.к. может быть связано с началом активного образования липопротеидов высокой плотности.

При изучении ФЛ эритроцитов (Ег), наблюдается аналогичная ситуация, что и при изучении сыворотки крови. Trp+Н.к. вызвал понижение уровня ФЛ в Ег старых крыс – на 30,5% ($p>0,05$), у зрелых крыс – на 8,5% ($p>0,05$), по сравнению с контрольными крысами (таблица 36).

Таблица 36 – Изменение количества фосфолипидов (нмоль/Ег) в эритроцитах крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	$2,0 \cdot 10^5 \pm 2,3 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^5 \pm 7,4 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^5 \pm 6,9 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^5 \pm 1,1 \cdot 10^6$
Trp+Н.к.	$1,6 \cdot 10^5 \pm 2,6 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^5 \pm 3,8 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^5 \pm 3,5 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^5 \pm 2,3 \cdot 10^6$

Таким образом, Trp+Н.к. у животных обеих возрастных групп, как до, так и после иммобилизационного стресс-воздействия, как в сыворотке, так и в эритроцитах крови вызывал тенденцию по уменьшению количества ФЛ. Возрастных различий во влиянии Trp+Н.к. на количество фосфолипидов сыворотки и Ег крови не выявлено.

При сравнении количества общего холестерина (ХС) в сыворотке крови между интактными зрелыми и старыми крысами достоверных различий обнаружено не было (таблица 37). На фоне иммобилизационного стресс-воздействия количество общего холестерина в сыворотке крови старых животных увеличилось на 5% ($p > 0,05$), у зрелых животных на 9,3% ($p > 0,05$).

Таблица 37 – Изменение количества холестерина (ммоль/л) в сыворотки крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	$1,89 \pm 0,18$	$2,06 \pm 0,07(1)$	$1,89 \pm 0,05$	$1,89 \pm 0,24$
Trp+Н.к.	$1,69 \pm 0,12$	$1,71 \pm 0,13(1)$	$1,72 \pm 0,25$	$2,07 \pm 0,49$

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p < 0,05$).

Введение Trp+Н.к. старым крысам на фоне иммобилизации приводило к тенденции по нормализации уровня ХС в сыворотке крови. Так если до введения Trp+Н.к., но в ходе иммобилизации уровень ХС в сыворотке крови старых крыс увеличился на 9% ($p > 0,05$), тогда как после введения Trp+Н.к. уровень ХС уменьшился на 9,6% ($p > 0,05$) по сравнению с интактными крысами (таблица 37).

Таким образом, Trp+Н.к. лишь имел тенденцию по положительному влиянию на уровень холестерина сыворотки крови животных обеих возрастных

групп, уменьшая его уровень. У старых крыс на фоне иммобилизационного стресс-воздействия введение сочетания Trp+Н.к. приводило уровень холестерина к норме, у зрелых крыс аналогичного эффекта не наблюдалось.

Изменение липопротеидного состава крови, как в норме, так и в эксперименте происходило в некоторых случаях аналогично с изменением липидов крови (таблица 38). Так, например количество липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП), изменяется аналогично количеству ТГ, то есть Trp+Н.к. до иммобилизации не изменял количество ЛПОНП, а на фоне иммобилизации увеличивал их в обеих возрастных группах. Следует отметить, что количество ЛПОНП во всех исследуемых группах старых крыс больше на 54% ($p < 0,05$), чем у зрелых крыс. При иммобилизационном стресс-воздействии уровень ЛПОНП у старых крыс практически не меняется, а у зрелых крыс - увеличивается в 1,5 раза ($p < 0,05$), по сравнению с интактными крысами (таблица 38).

Таблица 38 – Изменение количества липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП, ммоль/л) в крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	0,45±0,05(1)	0,41±0,13	0,27±0,03(1,3)	0,37±0,04(3)
Trp+Н.к.	0,48±0,12(2)	0,51±0,05	0,23±0,03(2,4)	0,46±0,07(4)

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p < 0,05$).

Аналогичная ситуация складывается при изучении липопротеидов низкой плотности (ЛПНП). Так в норме, количество ЛПНП крови старых крыс в среднем больше на 37% ($p > 0,05$), чем у зрелых крыс. Введение Trp+Н.к. старым крысам на фоне иммобилизационного стресс-воздействия привело уровень ЛПНП крови к нормальным значениям (так, на фоне стресса до инъекции Trp+Н.к. количество ЛПНП больше на 41% ($p < 0,05$), а после инъекции - больше всего на 10% ($p > 0,05$) по сравнению с интактными крысами), (таблица 39).

Таким образом, иммобилизационное стресс-воздействие оказывало негативное влияние на липопротеидный состав крови, увеличивая количество

ЛПНП и ЛПОНП у обеих возрастных групп. Введение старым крысам Trp+H.k., на фоне иммобилизационного стресс-воздействия, приводило количество ЛПНП и ЛПОНП сыворотке крови к нормальным значениям, а у зрелых крыс – увеличивал количество этих липопротеидов.

Таблица 39 – Изменение количества липопротеидов низкой плотности (ЛПНП, ммоль/л) в крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+H.k.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	0,92±0,10(1,2)	1,33±0,08(2,3)	0,77±0,10	0,83±0,11(3)
Trp+H.k.	1,30±0,33(1)	1,02±0,34	0,72±0,08	1,03±0,27

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

При изучении липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) как в норме, так и при инъекции Trp+H.k., возрастных различий не выявлено. Иммобилизационное стресс-воздействие у старых животных вызвало уменьшение уровня ЛПВП на 19% ($p>0,05$), а у зрелых - не изменяло. Введение Trp+H.k. старым и зрелым крысам до иммобилизационного стресс воздействия увеличивало количество ЛПВП в сыворотке крови, у старых крыс их стало больше на 6% ($p>0,05$), у зрелых – больше на 3,5% ($p>0,05$).

Таблица 40 – Изменение количества липопротеидов высокой плотности (ЛПВП, ммоль/л) в крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+H.k.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	0,83±0,11(1)	0,67±0,09(1)	0,85±0,03	0,85±0,15
Trp+H.k.	0,88±0,13	0,89±0,35	0,88±0,23	0,95±0,20

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Наиболее интересные результаты были получены при изучении ЛПВП на фоне стресса и введении Trp+H.k. У старых крыс инъекция Trp+H.k. на фоне иммобилизации увеличивала количество ЛПВП в сыворотке крови на 26% ($p>0,05$), у зрелых крыс происходило увеличение на 12% ($p>0,05$). Причем, если у старых животных количество ЛПВП сыворотки крови вернулось лишь к

норме, то у зрелых - их количество превысило норму на 12% ($p>0,05$) (таблица 40).

Таким образом, введение Trp+Н.к. крысам оказывало положительный эффект на организм, увеличивая количество ЛПВП в сыворотке крови, как до стресс-воздействия, так и после.

Изучение интегрального липопротеидного коэффициента (ЛК) у зрелых и старых крыс, в некоторой степени подтверждает ранее сделанные выводы об изменениях, происходящих у крыс в норме, при иммобилизации и в условии коррекции Trp+Н.к. (таблица 41).

Липопротеидный коэффициент (ЛК) рассчитывали по формуле:

$$\text{ЛК} = (\text{ЛПОНП} + \text{ЛПНП}) / \text{ЛПВП} \quad 11)$$

Таблица 41 – Изменение липопротеидного коэффициента в крови зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.)

название групп	старые крысы		зрелые крысы	
	до иммобилизации	иммобилизация	до иммобилизации	иммобилизация
контроль	1,65±0,20 (1,2)	2,59±0,32 (2,3,4)	1,22±0,10 (1)	1,41±0,20 (3)
Trp+Н.к.	2,02±0,44 (5)	1,72±0,52 (4)	1,07±0,20 (5)	1,59±0,35

Примечание: одинаковые цифры в скобках – пары достоверно различающихся показателей между группами ($p<0,05$).

Значение ЛК у старых интактных крыс в сыворотке крови в больше на 35% ($p<0,05$), чем у зрелых крыс. После стресс-воздействия значение ЛК у старых животных увеличилось на 57% ($p<0,05$), у зрелых животных на 16% ($p>0,05$). Введение Trp+Н.к. на фоне иммобилизации зрелым животным недостоверно увеличивало ЛК у зрелых крыс на 13% ($p>0,05$), у старых крыс происходило выраженное уменьшение величины коэффициента на 34% ($p<0,05$).

Таким образом, на фоне стресс-воздействия Trp+Н.к. оказывал гиполипидемический эффект на крыс старого возраста, у зрелых крыс подобного эффекта не выявлено. Однако следует отметить, что введение Trp+Н.к. на фоне стресса приводило к тому, что ЛК как у старых, так и у зрелых крыс стал очень близок по величине. Иммобилизационное воздействие вызывало негативные проатерогенные сдвиги в липидном и липопротеидном

составе крови у обеих возрастных групп. Введение Trp+H.k. зрелым и старым животным приводило к норме большинство показателей липидного и липопротеидного спектра крови. У старых животных сочетание Trp+H.k. на фоне иммобилизационного стресс–воздействия достоверно уменьшало ЛК, т.е. оказывало геропротективный гиполипидемический эффект.

5.6 - Влияние сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты на психо-эмоциональное состояние зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии

При изучении животных в тесте «открытое поле» было выяснено, что стресс-воздействие в виде иммобилизации вызывает снижение величины коэффициента суммарной двигательной активности (КСДА). Иммобилизация уменьшила двигательную активность у старых крыс на 76% ($p<0,05$), у зрелых крыс на 57% ($p<0,05$) (таблица 42), по сравнению с контролем.

Таблица 42 – Изменение коэффициента суммарной двигательной активности у зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс–воздействии и введении сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+H.k.)

Группы крыс	контроль	1-сутки после инъекции	2-сутки после инъекции	3-сутки после инъекции	12 часов после иммобилизации
Зрелые (физраствор)	24,5±2,9	11,3±2,7 **	7,8±2,3 **	4,8±1,2 **	10,5±3,6 **
Старые (физраствор)	19,3±1,7*	8,5±3,0 ** #	4,8±0,4 * ** #	4,6±1,2 **	4,5±0,7 * **
Зрелые (Trp+H.k.)	23,5±4,6	9,8±6,4 **	11,8±7,1 **	9,8±6,8 **	8,0±6,0 **
Старые (Trp+H.k.)	19,3±2,2	15,3±2,4	9,3±3,4 **	6,3±3,4 **	10,0±4,8 **

*Примечание: * $p<0,05$ при сравнении зрелых и старых крыс;*

*** $p<0,05$ при сравнении с контрольной группой (одного возраста);*

$p<0,05$ при сравнении между групп с инъекцией сочетания

Trp+H.k. и инъекцией физраствора (одного возраста).

Введение Trp+H.k. зрелым и старым животным вызывало увеличение двигательной активности; у старых крыс Trp+H.k. увеличивал величину КСДА на 30% ($p<0,05$), у зрелых крыс на 72% ($p<0,05$), по сравнению с крысами, получавшими инъекцию физраствора. Воздействие сочетания Trp+H.k. и последующая иммобилизация привели к увеличению величины КСДА у старых крыс на 122% ($p<0,05$), у зрелых крыс изменений не выявлено. Двигательная

активность при воздействии Trp+Н.к. и последующей иммобилизации у старых крыс полностью сравнилась с двигательной активностью зрелых интактных крыс, об этом говорит полное отсутствие достоверных различий между ними (таблица 42). Введение Trp+Н.к., особенно старым животным выявило его антистрессорные и антидепрессивные свойства как минимум на уровне поведения и двигательной активности [211]. Это может свидетельствовать о вовлечении производных L-триптофана и никотиновой кислоты в функционирование высшей нервной деятельности при иммобилизационном воздействии и развитии стресс-реакции.

Таким образом, в заключении можно отметить, что введение сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты крысам до и во время иммобилизационного стресс-воздействия приводило к выраженному антиоксидантному эффекту с ингибированием процессов ПОЛ в органах и системе крови. Никотиновая кислота, участвуя в метаболизме L-триптофана, усиливала его антиоксидантные свойства, создавая дополнительный резерв неферментативной АОЗ, за счет индукции его метаболизма по серотониновому пути. Введение сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты крысам при иммобилизационном стресс-воздействии нормализовала некоторые показатели обмена липидов крови, что отражает его некоторые потенциальные протекторные и адаптационные свойства.

Сочетание L-триптофана и никотиновой кислоты уменьшает интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и увеличивает антиокислительную активность (АОА), преимущественно в организме старых крыс: с возрастом происходит уменьшение антиокислительной эффективности комплекса L-триптофана и никотиновой кислоты. При этом у старых крыс он способствует нормализации липидного состава крови, демонстрируя геропротекторные качества неантиоксидантного генеза. В крови у старых крыс при стрессе комплекс L-триптофана и никотиновой кислоты увеличивает количество ЛПВП и активность антиокислительной системы, что приводит к уменьшению липопротеидного коэффициента, чего у зрелых крыс в этих условиях не выявлено.

У старых крыс иммобилизационное стресс-воздействие вызывает более значимое уменьшение двигательной активности, по сравнению со зрелыми крысами, что может указывать на большую зависимость липопероксидации от старения. Введение сочетания L-триптофана с никотиновой кислотой старым крысам при иммобилизационном стресс-воздействии вызывает адаптационное увеличение двигательной активности, которое может быть связано с антиоксидантным действием комплекса на головном мозге.

У интактных животных значимых возрастных физиологических, биохимических и поведенческих изменений обнаружить не удалось. Иммобилизационное стресс-воздействие вызывает физиологические (активация костного мозга), биохимические (увеличение ПОЛ, уменьшение АОА) и поведенческие (уменьшение двигательной активности) изменения у крыс, которые усиливаются с возрастом. Нейромедиаторы вегетативной нервной системы участвуют в этих изменениях: с возрастом в организме крыс наблюдается ослабление влияния парасимпатической нервной системы и усиливается - симпатической, что может приводить к возраст-зависимым стресс-обусловленным нарушениям. Антиоксидантное серотонинергическое действие L-триптофана проявляется в виде стресс-корректирующих возраст-зависимых влияний на физиологические, биохимические и поведенческие нарушения у крыс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значительная часть авторов утверждает, что перекисное окисление липидов (ПОЛ) является нормальным метаболическим процессом, широко представленным во всех органах и тканях организма [25, 108]. Благодаря влиянию общей АОА, уровень ПОЛ в организме поддерживается на достаточно низком уровне. При этом, процессы ПОЛ участвуют во многих физиологических и биохимических процессах организма: в модификации биологических мембран [25], в метаболизме оксида азота [162], в регуляции окислительного фосфорилирования [34], в биосинтезе простагландинов и стероидных гормонов [4, 170], в контроле клеточного деления [43, 107], в антимикробной системе фагоцита [54, 151].

Также многие авторы отмечают участие процессов ПОЛ в возрастной инволюции организма. Имеется ряд научных трудов, в которых отмечена активация процессов ПОЛ в периферической крови при старении [172, 273] и снижение ферментативной и неферментативной антиокислительной активности (АОА) [1, 68]. То есть процессы ПОЛ, и защита от них является общепризнанной и неотъемлемой частью процессов старения организма.

В литературе имеется множество упоминаний об активации ПОЛ и инактивации АОА в условиях экстремального стресс-воздействия, что является типичным процессом в развитии общего адаптационного синдрома. В ходе этого происходит нарушение проницаемости мембран, что может вызывать разобщение окисления и фосфорилирования в митохондриях, снижать чувствительность и качество рецепторных белков, а также активность примембранных ферментов [95].

Иммобилизационное стресс-воздействие должно усиливать возрастные различия в изменениях интенсивности ПОЛ и АОА. Но в литературе имеется некоторое противоречие на происходящие изменения с возрастом. В части источников отмечается усиление интенсивности ПОЛ с возрастом при экстремальном воздействии. Однако, в других источниках отмечено отсутствие достоверных изменений ПОЛ и АОА в организме и системе крови при стрессовых экстремальных ситуациях.

При психо-эмоциональном стресс-воздействии в организме развивается общий адаптационный синдром, ведущую роль в котором играет вегетативная нервная система [3, 19, 120, 143]. Нейромедиаторы симпатической вегетативной нервной системы (адреналин, норадреналин) и парасимпатической вегетативной нервной системы (ацетилхолин) участвуют в активации и изменениях системы ПОЛ/АОА при стрессе [67, 87]. Имеются данные о вовлечении катехоламинов в активацию процессов ПОЛ [127, 173], об участии ацетилхолина в изменении ПОЛ информации не достаточно. Известно, что существует антагонизм между симпатической и парасимпатической нервными системами, но об их совместном влиянии на систему ПОЛ/АОА при стрессе данные отсутствуют. В литературе, в основном, рассматривается вопрос о влиянии адреналина и ацетилхолина на ПОЛ организмов зрелого возраста, но в возрастном аспекте данный вопрос в литературных источниках не раскрывается. Поэтому, представляет интерес изучить влияние адреналина и ацетилхолина на изменения в системе ПОЛ/АОА при экстремальном воздействии и в возрастном аспекте.

L-триптофан в присутствии повышенного содержания никотиновой кислоты может оказывать антиоксидантный и антистрессорный эффект. Никотиновая кислота участвует в метаболизме L-триптофана, повышая в организме уровень его производных, ряд из которых можно отнести к нейрометаболитам (серотонин) и антиоксидантам (мелатонин) [6, 222]. В современной литературе мало информации о совместном влиянии L-триптофана и никотиновой кислоты на развитие ПОЛ, на изменение липопротеидного статуса и на развитие депрессии, вызванных стресс-воздействием. Поэтому представляет интерес изучение действия сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты на процессы ПОЛ/АОА в организме крыс разного возраста при иммобилизационном стресс-воздействии.

Динамика изменений процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиокислительной активности (АОА) в периферической крови крыс при развитии адаптационного синдрома на экстремальное воздействие имеет фазный характер, соответствующий классической схеме развития стресса [40].

То есть, в динамике изменения интенсивности ПОЛ и АОА можно выделить фазы шока и противошока, объединяющиеся в стадию тревоги, также наблюдается стадия резистентности и заключительная стадия, приводящая к истощению или адаптации.

При исследовании показателей коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) в периферической крови крыс были получены данные, демонстрирующие фазное изменение ПОЛ в ходе стресс-реакции с проявлением всех стадий (шок, противошок, (тревога), резистентность). Имобилизационное стресс-воздействие увеличивало уровень КПОЛ в периферической крови животных: у зрелых крыс уровень КПОЛ был выше, чем у старых крыс. Изменения КПОЛ, вызванные имобилизацией у зрелых крыс, происходят раньше, чем у старых крыс, с опережением в несколько часов (рисунок 7, 12).

Имобилизационное воздействие на животных также привело к фазной динамике изменении величины коэффициента антиокислительной активности (КАОА) в периферической крови крыс с проявлением стадии тревоги, резистентности и адаптации (рисунок 8). Развитие стадий КАОА в периферической крови крыс при стресс-воздействии происходило в обратной зависимости от стадий изменения КПОЛ и связано на стадии тревоги с неферментативной АОА (рисунок 10), а на последующих стадиях с ферментативной АОА (рисунок 9, 12). Таким образом, для дальнейших экспериментов наиболее показательным является время начала стадии резистентности (12 часов после имобилизации), в данное время происходит запуск механизмов долговременной адаптации с активацией синтеза ферментативных антиоксидантов (рисунок 9, 12).

При изучении процессов ПОЛ в миелокариocyтах костного мозга при имобилизации были получены данные, подтверждающие изменение коэффициента ПОЛ в соответствии со стадиями стресс-реакции (рисунок 12). Миелокариocyты аналогично периферической крови реагировали на имобилизационное стресс-воздействие, что подтверждается положительной корреляцией (коэффициент 0,61 ($p < 0,05$)) между КПОЛ крови и

миелокариоцитов (рисунок 13). Уровень ПОЛ в миелокариоцитах на всех стадиях стресс-реакции был выше, чем в периферической крови. Клетки костного мозга опосредованно через регуляторные системы организма (нервную, гуморальную или нейромедиаторную) раньше реагирует на экстремальное воздействие, по сравнению с периферической кровью [146, 183].

Изучение динамики ПОЛ в межклеточной среде костного мозга при экстремальном воздействии показало прямую зависимость с изменениями динамики ПОЛ в миелокариоцитах (рисунок 14). В межклеточной среде костного мозга (межклеточная жидкость, сосуды, нервные волокна и их окончания, клетки соединительной ткани) происходят первоначальные изменения интенсивности процессов ПОЛ, вызванные иммобилизационным стресс-воздействием, затем изменения ПОЛ передаются на миелокариоциты красного костного мозга и, в заключение - на периферическую кровь (рисунок 15).

Уровень ПОЛ в миелокариоцитах зрелых крыс при развитии стадий стресс-реакции (шок, противошок, резистентность) был больше, чем у старых крыс. Высокий уровень ПОЛ в миелокариоцитах костного мозга зрелых крыс, по сравнению со старыми крысами, может быть связан с высокой интенсивностью пролиферации клеток [108, 185].

При иммобилизационном стресс-воздействии количество ретикулоцитов, характеризующих морфофункциональное состояние костного мозга, изменялось в крови согласно стадиям стресс-реакции (рисунок 16). На ранней стадии развития стресса (тревога) изменение количества ретикулоцитов связано с миграцией клеток из костного мозга в кровь, на последующих этапах с усилением пролиферации в клетках красного костного мозга [100, 111, 136].

Сравнивая динамику количества ретикулоцитов в крови при иммобилизационном стресс-воздействии между зрелыми и старыми крысами, было выяснено, что с возрастом происходит уменьшение роли процессов ПОЛ в делении клеток костного мозга (рисунок 18). Высокая интенсивность процессов ПОЛ в костном мозге зрелых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии обеспечивает более высокую, по сравнению со старыми крысами,

пролиферативную активность, что в итоге может приводить к увеличению количества ретикулоцитов в крови.

Увеличение интенсивности процессов ПОЛ в миелокариоцитах костного мозга на ранних стадиях стресс-реакции повышает уровень повреждений в мембранных структурах клеток [173]. Дополнительно к этому может наблюдаться оксидативное повреждение клеточных белковых комплексов и генетического аппарата клетки [5], что будет сопровождаться усилением в работе репаративных механизмов, в том числе, и механизмов репарации ДНК [102, 103, 113]. Для того, чтобы поврежденные участки ДНК стали более доступны репаративным ферментам, они должны освободиться от ДНК-связывающих белков и их комплексов. Это увеличивает доступ к освобожденной спирали ДНК различных специфических ферментных систем, которые контролируют работу внутриядерных механизмов. Такая активация ДНК может дополнительно приводить к активации механизмов синтеза мРНК и образованию репликативных «вилкок», приводящих к удвоению ДНК, делению ядра и всей клетки [101, 103, 113]. Таким образом, активация ПОЛ в костном мозге приводит к усилению активности пролиферации, сопровождающейся увеличением количества ретикулоцитов в периферической крови (рисунок 18).

Активация ПОЛ в миелокариоцитах при стрессе приводила к последующей активации АОА: на ранней стадии стресс-реакции (тревога - шок, противошок) была задействована неферментативная АОС, на последующих стадиях происходила активация ферментативной АОС (рисунок 20, 21). Изменения АОА в миелокариоцитах при стрессе носили стадийный характер (шок, противошок, резистентность) и находились в обратной зависимости от интенсивности ПОЛ. По-видимому, в данном случае, первоначально изменялась интенсивность процессов ПОЛ, впоследствии приводящая к ответным изменениям в системе АОА (рисунок 12, 15, 22).

Возрастные различия изменения АОА в миелокариоцитах появлялись только в фазе резистентности, у старых крыс в этой фазе интенсивность АОА была больше на 30,9% ($p > 0,05$), по сравнению со зрелыми крысами. Увеличение АОА у старых животных в фазе резистентности было связано с

увеличением активности ферментов с антиокислительными свойствами (рисунок 21).

Для дальнейшего изучения изменений в системе ПОЛ/АОА наиболее рационально исследовать период от окончания стадии тревоги (фаза противошока) к переходу на стадию резистентности - это соответствует 12 часам после иммобилизационного стресс-воздействия. На этой стадии (окончание стадии тревоги и начало стадии резистентности) происходила активация адаптационных механизмов с началом синтеза антиокислительных ферментов.

Таким образом, у интактных животных с возрастом наблюдалась тенденция по уменьшению интенсивности процессов ПОЛ в системе крови. Процессы ПОЛ и АОА в системе крови крыс при иммобилизационном стресс-воздействии изменялись в зависимости от стадий стресс-реакции. Изменения интенсивности АОА в системе крови находились в противофазе к изменениям ПОЛ. У старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии изменения ПОЛ в системе крови происходили на 3-6 часов раньше, но они менее значимы по величине, чем у зрелых крыс. Это можно связать с возраст-зависимым уменьшением эффективности неферментативной антиокислительной системы крови. Активация ПОЛ в системе крови крыс при иммобилизационном стресс-воздействии вызывает увеличение количества ретикулоцитов. С возрастом при стрессе происходило уменьшение активности костного мозга, выражающееся в ретикулоцитопении, что могло быть связано с возрастным уменьшением интенсивности ПОЛ в миелокариocyтах.

Введение адреналина зрелым и старым крысам до иммобилизационного стресс-воздействия вызывало активацию антиокислительной активности (АОА) в сыворотке крови, что приводило к инаktivации перекисного окисления липидов (ПОЛ). Так как эксперимент длился четверо суток, то выявленное увеличение АОА в сыворотке крови, можно связать с отдаленным эффектом адаптации организма животных на первоначальную активацию ПОЛ из-за введения адреналина. Ацетилхолин не оказывал заметного влияния на систему ПОЛ и АОА в сыворотке крови зрелых и старых крыс до иммобилизационного

стресс-воздействия.

При изучении коэффициентов ПОЛ и АОА в костном мозге на фоне влияния нейромедиаторов было определено, что эффект от воздействия адреналина и ацетилхолина на миелокариоциты зрелых и старых крыс *in vivo* был сильнее, по сравнению с аналогичным воздействием на периферическую кровь. Наиболее сильно на воздействие медиаторов реагировала межклеточная среда костного мозга, являясь первопричиной дальнейших изменений ПОЛ и АОА непосредственно в миелокариоцитах и в сыворотке крови.

У зрелых и старых крыс в межклеточной среде костного мозга адреналин не влиял на изменения ПОЛ, что может быть связано с активацией АОА, вызванной действием катехоламинов [99, 131, 272, 309].

Ацетилхолин, напротив, способствовал поддержке повышенного уровня ПОЛ в межклеточной среде костного мозга зрелых и старых крыс до иммобилизационного стресс-воздействия. Это могло происходить в результате постепенного высвобождения связанного ацетилхолина и его влияния на активацию NO-синтазы и фосфолипазы А₂, способствующих образованию свободных радикалов [35, 42, 96].

При изучении действия нейромедиаторов в условиях иммобилизационного стресс-воздействия были получены данные по наличию антагонизма между адреналином и ацетилхолином в действии на систему ПОЛ и АОА. Введение адреналина с последующей иммобилизацией приводило к ускорению развития стресс-реакции со смещением фаз развития процессов ПОЛ и АОА в сыворотке крови зрелых и старых животных. Адреналин в сыворотке крови у животных разного возраста ускорял изменения ПОЛ и АОА при стрессе, ацетилхолин, в этих же условиях, замедлял изменения ПОЛ и АОА.

Ацетилхолин в некоторых случаях является антагонистом к адреналину и поэтому его введение способно в некоторой степени препятствовать действию симпатической нервной системе при стрессе [35, 310]. Введение парасимпатического нейромедиатора ацетилхолина, антагониста симпатической нервной системы, приводило к замедлению развития стресс-

реакции. При стрессе в миелокариocyтах и МС костного мозга зрелых и старых крыс адреналин ускорял динамику изменений процессов ПОЛ и АОА, ацетилхолин, напротив, замедлял динамику изменений процессов ПОЛ и АОА.

С увеличением возраста крыс наблюдалось уменьшение эффективности действия нейромедиаторов на интенсивность процессов ПОЛ. Это можно связать с возрастзависимым уменьшением чувствительности рецепторов клеток к адреналину и ацетилхолину у старых крыс [5, 37, 113]. Рецепторов становится меньше, в белковых субъединицах рецепторов с возрастом, накапливаются ошибки, что приводит к ухудшению связи между нейромедиатором и рецептором и снижению качества передачи внутриклеточных сигналов другим посредникам [37, 74].

При изучении миелокариocyтов *in vitro* было выяснено, что воздействие адреналина и ацетилхолина приводит к увеличению величины КПОЛ в миелокариocyтах зрелых и старых крыс.

Введение адреналина в инкубационную среду миелокариocyтов приводило к большей активации процессов ПОЛ в клетках старых крыс по сравнению с клетками зрелых крыс. Введение ацетилхолина в инкубационную среду с миелокариocyтами приводило к обратным результатам: активация процессов ПОЛ была выше в клетках зрелых крыс по сравнению с клетками старых крыс. Таким образом, с возрастом уменьшается вклад парасимпатического отдела вегетативной нервной системы и увеличивается вклад симпатического отдела в активацию ПОЛ (рисунок 27).

При изучении ПОЛ в инкубируемых миелокариocyтах было обнаружено явление биолюминесценции с активацией ПОЛ. Введение адреналина и ацетилхолина в инкубационные среды с миелокариocyтами приводило к сильному, но кратковременному увеличению свечения, связанного с работой нейромедиаторов.

Адреналин в большей степени увеличивал люминесценцию в миелокариocyтах старых крыс, по сравнению со зрелыми крысами. Причина повышенного свечения в миелокариocyтах старых крыс могла быть связана с наличием в них большего количества легкоокисляемого субстрата и их

повышенной доступности для процессов ПОЛ. С возрастом происходит снижение чувствительности рецепторов клеток старых крыс к адреналину и увеличение ошибок в передаче сигнала от гормона (нейромедиатора) в клетку [7, 184], что и приводит к активации ПОЛ.

Ацетилхолин в большей степени увеличивал люминесценцию в миелокариocyтах зрелых крыс по сравнению со старыми крысами. Причина повышенного свечения в миелокариocyтах зрелых крыс может заключаться в большем количестве и качестве холинорецепторов, находящихся в них [241, 258]. Возможно, с увеличением возраста, происходит уменьшение количества холинорецепторов, кроме того, их нормальное функционирование тоже может снижаться. Причиной этому могут служить аутоиммунные реакции и нарушения в синтезе белковых субъединиц холинорецепторов и сопутствующих белков. Это соответствует последним научным данным, в которых изложена концепция, отмечающая уменьшение с возрастом влияния парасимпатического отдела (ацетилхолин) вегетативной нервной системы в организме человека [75].

Старение организма приводит к снижению его адаптивных возможностей [5, 185]. Особое место в адаптации занимают нейромедиаторы и гормоны, в частности, производные L-триптофана (Trp) [7]. Метаболизм Trp в организме человека и животных протекает по двум направлениям: кинурениновый и серотониновый путь [222, 283]. В кинурениновом пути метаболизирует до 95% Trp, конечным продуктом которого является рибонуклеотид никотиновой кислоты, который затем превращается в $\text{НАД}^+/\text{НАДН}_2$. Остальные 5% Trp метаболизируют до биогенного амина серотонина, который может превратиться в эпифизарный гормон мелатонин с выраженным антиокислительным эффектом [132, 294] и в группу индольных производных с различными по силе антиокислительными свойствами [26, 210, 234]. Никотиновая кислота, как конечный продукт метаболизма Trp, по механизму обратной связи ингибирует фермент триптофанпирролазу, катализирующую пусковую реакцию кинуренинового пути. Поэтому введение в организм никотиновой кислоты может приводить к блокировке кинуренинового пути и, как следствие, активировать серотониновый путь с увеличением выхода

серотонина, мелатонина и группы индолов (рисунок 1). Увеличение уровня серотонина будет препятствовать наступлению депрессии и психо-эмоционального стресса у людей [193, 197, 221, 238, 277], а увеличение количества индолов и мелатонина будет увеличивать в организме антиокислительную активность и уменьшать перекисное окисление липидов. Тесная связь метаболизма эндогенной никотиновой кислоты и Trp дает основание для их совместного использования в качестве лекарственного средства. Увеличение уровня серотонина будет препятствовать наступлению депрессии и психо-эмоционального стресса у людей, а увеличение количества индолов и мелатонина будет увеличивать в организме антиокислительную активность и уменьшать перекисное окисление липидов.

Применение сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты (Trp+Н.к.) на зрелых и старых крысах, подтвердило предположение о его антиоксидантном, гиполипидемическом и антидепрессивном действии. Сочетание Trp+Н.к. в норме и при стрессе проявляло антиоксидантный эффект с выраженным увеличением значений коэффициента антиокислительной активности (КАОА) в сыворотке крови зрелых и старых крыс. Введение сочетания Trp+Н.к. создавало в сыворотке крови крыс дополнительный резерв в неферментативной антиокислительной системе. Сравнение между зрелыми и старыми крысами показало, что с возрастом антиоксидантное влияние Trp+Н.к. на антиокислительную активность (АОА) в сыворотке крови уменьшается, и это связано с ухудшением в работе ферментных комплексов по метаболизму L-триптофана.

Изучение перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови и эритроцитах подтвердило данные об антиокислительном действии сочетания Trp+Н.к. на зрелых и старых крыс. Воздействие Trp+Н.к. уменьшало или приводило к норме значения коэффициента перекисного окисления липидов (КПОЛ) у контрольных и опытных групп животных. В эритроцитах крови антиоксидантный эффект наблюдался в результате опосредованного влияния сочетания Trp+Н.к., через изменения, происходящие в сыворотке крови.

В миелокариocyтах зрелых и старых крыс Trp+Н.к., так же как и в

периферической крови, однозначно проявлял антиоксидантный эффект. Сочетание Tgr+H.k. уменьшало уровень ПОЛ в миелокариocyтах костного мозга в нормальных условиях и нормализовало уровень ПОЛ при иммобилизационном стресс–воздействии. При анализе возрастных различий в изменениях ПОЛ между старыми и зрелыми крысами, были получены данные, демонстрирующие большее влияние Tgr+H.k. на миелокариocyты зрелых крыс, обнаруженное различие связано с возрастным нарушением в метаболизме L–триптофана.

При изучении АОА в миелокариocyтах зрелых и старых крыс было выявлено, что сочетание Tgr+H.k. проявляло сильное антиокислительное действие в качестве структурного антиоксиданта. Tgr+H.k. в 1,5 раза увеличивал уровень общей неферментативной АОА в миелокариocyтах зрелых и старых крыс в контроле и при иммобилизации. При изучении действия Tgr+H.k. на ферментативную часть АОС изменений обнаружено не было.

Изучение головного мозга показало, что на фоне экстремального воздействия у старых крыс в нем происходила активация ПОЛ. Введение Tgr+H.k. при иммобилизации, как старым, так и зрелым крысам, приводило к снижению уровня ПОЛ в головном мозге. Кроме того, Tgr+H.k. повышал антиокислительную активность; у старых крыс, в основном, усиливалась неферментативная АОА, у зрелых крыс - ферментативная АОА. Tgr+H.k. оказывал выраженный антиоксидантный и антистрессорный эффект на головной мозг зрелых и старых крыс в норме и при иммобилизационном стресс–воздействии.

При изучении печени как до, так и после иммобилизационного стресс–воздействия также проявился антиоксидантный эффект Tgr+H.k. Особенно заметное влияние Tgr+H.k. оказал на группу старых крыс, его введение приводило у этой группы к заметному уменьшению ПОЛ и активации АОС в печени.

При изучении поведения животных в тесте «открытое поле» введение Tgr+H.k. зрелым животным заметного изменения двигательной активности не вызвало, у старых животных, напротив, на фоне иммобилизации введение

Tgr+H.k. увеличивало двигательную активность крыс, приводя ее к норме. Таким образом, воздействие сочетание Tgr+H.k., как минимум на уровне поведения и двигательной активности, особенно в группе старых крыс, показало свои антистрессорные и антидепрессивные свойства.

Имобилизационное стресс-воздействие приводило к негативным изменениям в липидном и липопротеидном составе крови у обеих возрастных групп. Введение Tgr+H.k. зрелым и старым крысам нормализовало большинство показателей липидных и липопротеидных показателей крови. Введение Tgr+H.k. на фоне имобилизационного стресс-воздействия привело к тому, что липопротеидный интегральный коэффициент (ЛК), как у старых, так и у зрелых крыс стал очень близок между собой по величине. У старых животных Tgr+H.k. в сочетании со стресс-реакцией достоверно уменьшал ЛК, т.е. оказывал стойкий гиполипидемический эффект, у зрелых крыс подобного эффекта выявлено не было.

Таким образом, введение Tgr+H.k. зрелым крысам до и во время имобилизационного стресс-воздействия приводило к выраженному антиоксидантному эффекту с ингибированием процессов ПОЛ в органах и системе крови крыс. Никотиновая кислота, участвуя в метаболизме L-триптофана, усиливала его антиоксидантные свойства, создавая дополнительный резерв неферментативной АОЗ, за счет индукции его метаболизма по серотониновому пути. С возрастом происходило уменьшение антиокислительной эффективности совместного влияния L-триптофана и никотиновой кислоты. В крови у старых крыс при стрессе Tgr+H.k. увеличивал количество липопротеидов высокой плотности и активность антиокислительной системы, что приводило к уменьшению коэффициента атерогенности, чего у зрелых крыс в этих условиях не выявлено.

Tgr+H.k. при имобилизационном стресс-воздействии вызывал у старых крыс адаптационное увеличение двигательной активности, которое могло быть связано с антиоксидантным действием Tgr+H.k. на головной мозг. Антиоксидантное серотонинергическое действие L-триптофана проявлялось в виде стресс-корректирующих возраст-зависимых влияний на биохимические,

физиологические и поведенческие нарушения у крыс, вызванные иммобилизационным стресс-воздействием.

В итоге, можно заключить, что у интактных крыс значимых возрастных физиологических, биохимических и поведенческих изменений не обнаружено. Иммобилизационное стресс-воздействие вызывает физиологические (активация костного мозга), биохимические (увеличение ПОЛ, уменьшение АОА) и поведенческие (уменьшение двигательной активности) изменения у крыс, которые усиливаются с возрастом. Нейромедиаторы вегетативной нервной системы участвовали в этих изменениях: с увеличением возраста в организме старых крыс наблюдалось ослабление влияния парасимпатической нервной системы и усиливалось - симпатической, что являлось причиной выявленных возраст-зависимых нарушений при стресс-воздействии (рисунок 27). Антиоксидантное серотонинергическое действие L-триптофана проявлялось в виде стресс-корректирующих возраст-зависимых влияний на физиологические, биохимические и поведенческие нарушения у крыс, вызванные иммобилизационным стресс-воздействием.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам, которым показан длительный постельный режим (лечение травматических повреждений, инсульта, инфаркты) необходимо исследование уровня процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиокислительной активности (АОА) с целью выяснения их про_ и антиоксидантного статуса.

2. При определении в клинической практике параметров ПОЛ и АОА, рекомендуется использовать расчетные интегральные коэффициенты перекисного окисления липидов (КПОЛ) и антиокислительной активности (КАОА), позволяющие более точно подойти к оценке про_ и антиоксидантного статуса у пациентов.

3. Пациентам, с длительным постельным режимом, имеющим показания к коррекции изменений величины КПОЛ и КАОА, рекомендуется принимать L-триптофан в сочетании с никотиновой кислотой в общепринятых суточных дозировках.

4. Рекомендуется использовать в педагогической практике, на кафедрах с биологическим и медицинским профилем, материалы диссертации, описывающие возрастзависимые аспекты участия вегетативной нервной системы в регуляции интенсивности процессов перекисного окисления липидов и антиокислительной активности при стресс-воздействии.

ВЫВОДЫ

1. При иммобилизационном стресс-воздействии процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиокислительной активности (АОА) в системе крови крыс изменяются в зависимости от стадий стресс-реакции, при этом у старых крыс изменения активности процессов ПОЛ происходят на 3-6 часов раньше, чем у зрелых, что возможно связано с возраст-зависимым уменьшением эффективности неферментативной антиокислительной системы.

2. В эксперименте при стрессе нейромедиаторы вегетативной нервной системы оказывают влияние на изменение интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ); адреналин при иммобилизационном стресс-воздействии в системе крови крыс способствует быстрому и более значимому увеличению интенсивности процессов ПОЛ, а ацетилхолин - более продолжительному, но менее значимому изменению ПОЛ.

3. С увеличением возраста у крыс наблюдается ослабление влияния парасимпатического отдела вегетативной нервной системы (ацетилхолин) и усиление симпатического отдела вегетативной нервной системы (адреналин) на изменения интенсивности процессов перекисного окисления липидов, что способствует более ранней активации этих процессов при иммобилизационном стресс-воздействии в системе крови старых крыс и снижению пролиферативного потенциала костного мозга при старении.

4. Воздействие сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты в условиях иммобилизационного стресс-воздействия вызывает ингибирование процессов перекисного окисления липидов в системе крови и органах крыс, проявляя антиоксидантные свойства, при этом с увеличением возраста у старых крыс происходит уменьшение антиокислительной эффективности сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты.

5. Иммобилизационное стресс-воздействие вызывает негативные гиперлипидемические изменения в периферической крови крыс старого возраста, но в условиях воздействия сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты наблюдается нормализация липидного и липопротеидного состава крови, демонстрируя геропротективные, гиполлипидемические качества неантиоксидантного генеза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Er	– эритроциты
hν	– электромагнитное излучение
n	– выборка
Trp	– L-триптофан
Trp+Н.к.	– совместное действие L-триптофана и никотиновой кислоты
АО	– антиоксидант
АОА	– антиокислительная активность
АОЗ	– антиокислительная защита
АОС	– антиокислительная система
АОФ	– антиокислительные ферменты
Н.к.	– никотиновая кислота, витамин Р.Р.
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОФА	– диоксифенилаланин
КАОА	– коэффициент антиокислительной активности
КПОЛ	– коэффициент перекисного окисления липидов
КСДА	– коэффициент суммарной двигательной активности
ЛК	– Липопротеидный коэффициент
ЛП	– липопротеиды
ЛПВП	– липопротеиды высокой плотности
ЛПНП	– липопротеиды низкой плотности
ЛПОНП	– липопротеиды очень низкой плотности
МАО	– моноаминоксидаза
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
МС	– межклеточная среда
М-ХР	– мускариновые холинорецепторы
ОАА	– Общая антиокислительная активность
ОЛ	– общие липиды
ОХ	– общий холестерин
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
ПОЛ/АОА	– перекисное окисление липидов/антиокислительная активность
РНК	– рибонуклеиновая кислота
ТГ	– триглицериды
ФДЭ	– фосфодиэстераза
ФЛ	– фосфолипиды
ФЛА2	– фермент фосфолипазы А2
ХС	– холестерин
цАМФ	– циклическая аденозинмонофосфорная кислота
ЦНС	– центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абраменко, Ю.В. Оценка клинической эффективности, вазоактивного и метаболического эффектов мексидола у пациентов пожилого возраста с дисциркуляторной энцефалопатией / Ю.В. Абраменко // Журнал неврологии и психиатрии. – 2011. – №11. – С.35.
2. Айрапетянц, М.Г. Роль свободно-радикального окисления липидов в механизмах адаптации / М.Г. Айрапетянц, Н.В. Гуляева // Вестник АМН СССР. – 1988. – № 11. – С. 49–55.
3. Акарачкова, Е.С. Синдром вегетативной дистонии у современных детей и подростков / Е.С. Акарачкова, С.В. Вершинина // Педиатрия. – 2010. – № 6. – С. 130.
4. Александровский, Ю.А. Неврозы и перекисное окисление липидов / Ю.А. Александровский, М.В. Поюровский, Г.Г. Незнамов. – М.: Наука, 1991. – 144 с.
5. Анисимов, В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / В.Н. Анисимов. – СПб.: Наука, 2008. – Т.1. – 481 с.; Т.2. – 434 с.
6. Анисимов, В.Н. Световой режим, старение и рак / В.Н. Анисимов, И.А. Виноградова, М.Ф. Борисенко // Пробл. старения и долголетия. – 2012. – Т.21, прил. – С.5.
7. Анисимов, В.Н. Старение женской репродуктивной системы и мелатонин / В.Н. Анисимов, И.А. Виноградова. – СПб.: Изд-во «Система», 2008. – 44с.
8. Арташян, О.С. Изучение функциональной активности тучных клеток при иммобилизационном стрессе / О.С. Арташян, Б.Г. Юшков, Е.А. Мухлынина // Цитология. – 2006. – Т.48, №8. – С.665–668.
9. Афанасьева, О.И. Иммуноферментный метод определения липопропротеидов / О.И. Афанасьева, И.Ю. Адамова, Г.Ф. Беневоленская и др. // Бюлл. exper. биол. – 1995. – № 10. – С.398—401.
10. Барабой, В.А. Влияние возраста на интенсивность перекисного окисления липидов в крови / В.А. Барабой, В.Э. Орел, Н.Н. Дзятковская // Тез. и реф. докл. 5 Всесоюз. съезда геронтологов и гериатров (Тбилиси, 22-25 нояб.). – Киев, 1988. – Ч.1. – С.54.
11. Бараненко, В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений / В.В. Бараненко // Цитология. – 2006. – Т.48, №6. – С.465.
12. Беловол, А.Н. Эффективность симвастатина в профилактике и лечении

- атеросклеротических заболеваний / А.Н. Беловол, И.И. Князькова // Внутрішня медицина. – 2009. – № 1. – С.64.
13. Бизунок, Н.А. Адренергическая регуляция клеточной продукции активных форм кислорода / Бизунок Н.А., Дубовик Б.В., Наджарян А.В. // Рецепт. – 2007. Exp Physio. – 2014. – №.7. – С.34–38.
 14. Бокерия, Л.А. Монография «Все о холестерине (национальный доклад)»: заключения и рекомендации / Л.А. Бокерия, Р.Г. Органов // Профилактическая медицина. – 2010.– Т.37, № 2. – С.37.
 15. Бондарев, С.А. Клинико-инструментальные особенности аритмического варианта клинического течения стрессорной кардиомиопатии при хроническом профессиональном физическом и психоэмоциональном перенапряжении / С.А.Бондарев // Вестник аритмологии. – 2012. – № 67. – С.45–47.
 16. Боровкова, Т.А. Современное состояние проблемы взаимоотношений цереброваскулярных и сердечнососудистых заболеваний в пожилом и старческом возрасте / Т.А. Боровкова, В.С. Мякотных // Успехи геронтологии. – 2010. – № 3. – С.409–502.
 17. Будовская, Л.А. Механизмы воспаления при сочетании бронхиальной астмы и ишемической болезни сердца / Л.А. Будовская // Украинский пульмонологический журнал. – 2012. – № 1. – С.68–71.
 18. Бузуева, И.И. Влияние хронического стресса на структуру надпочечника крыс гипертензивной линии Нисаг после превентивного лечения тетраозонином / И.И. Бузуева, Е.Е. Филюшина, М.Д. Шмерлинг и др. // Бюлл. СО РАМН. – 2010. –Т.30, № 4. – С.56–61.
 19. Бузунов, А.Ф. Формирование соматических последствий адаптационного синдрома / А.Ф. Бузунов. – М.: Практическая медицина, 2010. – 339с.
 20. Буков, Ю.А. Возможности коррекции липидного обмена у женщин пожилого возраста / Ю.А. Буков, О.Н. Бурбанова // Ученые записки Таврического нац. универ. им. В.И. Вернадского. – 2012. – Серия. Биология, хими». - Т.25, № 2. – С.44–50.
 21. Бурлакова, Е.Б. Биохимические механизмы действия антиоксидантов / Е.Б. Бурлакова // 5 Всесоюз. Биохим. съезд.: тез. докл. симпоз. – М. – 1985. – Т.1. – С.85–90.

22. Бурлакова, Е.Б. Взаимосвязь между содержанием антиоксидантов и вязкостью липидов в мембранах органелл в норме / Е.Б. Бурлакова, А.Н. Голощапов, Р.Ф. Керимов // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 1986. – Т.150, № 4. – С.431–433.
23. Бурлакова, Е.Б. Молекулярная биофизика клетки. Антиоксиданты / Е.Б. Бурлакова // Журн. Рос. хим. общества им. Д.И. Менделеева. – 2007. – Т.51, № 1. – С.3–8.
24. Визир, В.А. Современные подходы к лечению гиперлипидемии / В.А. Визир, А.Е. Березин // Запорожский медицинский журнал. – 2011. – Т.13, № 1. – С.108–111.
25. Владимиров, Ю.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурина // Успехи биологической химии – 2009. – Т.49. – С.341–349.
26. Власенко, Т.Н. Современные подходы к фармакологической профилактике радиационных поражений: [электр. ресурс] / Т.Н. Власенко, В.Б. Назаров, А.Н. Гребенюк // www.medline.ru, Фармакология. – 2010. – Т.11. – С.230. – Режим доступа: http://www.medline.ru/public/pdf/11_019.pdf
27. Волкова, Ю.В. Возрастные особенности изменения содержания низкомолекулярных антиоксидантов в мозге и печени крыс, подвергнутых иммобилизационному стрессу / Ю.В. Волкова // Учен. зап. Таврического нац. универ. им. В.И. Вернадского. – 2011. – Серия. Биология, химия. - Т.24, № 2. - С.91–96.
28. Волчегорский, И.А., Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма / И.А., Волчегорский И.И., Долгушин О.Л. Колесников и др. – Челябинск: ЧГПУ, 2000. – 167 с.
29. Гаврилов, М.А. Возрастные изменения липидного обмена и эффект трансфер фактора / М.А. Гаврилов, И.В. Мальцева, В.Е. Чернилевский // Доклады МОИП. Секция Геронтологии. – М., 2012. – Т.50. – С.53.
30. Гаджиев, Н.Д. Практическое значение сравнительного исследования малонового диальдегида в перитонеальном экссудате, сыворотке крови и моче у больных с распространенным перитонитом / Н.Д. Гаджиев, С.В. Сушков, Е.М. Климова // Международный медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С.74.
31. Галимова, Э.Ф. Влияние экстремальных факторов на мужскую

- репродуктивную систему / Э.Ф. Галимова, Р.Р. Фархутдинов, Ш.Н. Галимов, Т.Р. Гизаттулин // Проблемы репродукции. – 2010. – № 4. – С.60.
32. Геворкян, А. Ш. Изучение процесса перекисного окисления липидов в печени и легких животных при эхинококкозе / А.Ш. Геворкян // Российский паразитологический журнал. – 2011. – № 3. – С. 34
 33. Гладилов, В.В. Гипоксия и гипероксия в онтогенезе системы крови / В.В. Гладилов. – Сыктывкар: Изд-во Сыктывкар. ун-та, 1996. – 206 с.
 34. Глебов, А.Н. Роль кислородсвязывающих свойств крови в развитии окислительного стресса, индуцированного липополисахаридом: монография / А.Н. Глебов, Е.В. Шульга, В.В. Зинчук; под ред. Зинчука В.В. – Гродно: ГрГМУ, 2011. – 216 с.
 35. Голиков, С.Н. Холинэргическая регуляция биохимических систем клетки / С.Н. Голиков, В.Б. Долго-Сабуров, Н.Р. Елаев и др. – М.: Медицина, 1985. – 220 с.
 36. Голубев, А.Г. Биохимия продления жизни / А.Г. Голубев // Успехи геронтологии. – 2013. – № 12. – С.57.
 37. Гомазков, О.А. Старение мозга и нейротрофическая терапия / О.А. Гомазков. – М.: ИКАР, 2011. – 92 с.
 38. Горизонтов, П. Д. Стресс и система крови / П.Д. Горизонтов, О.И. Белоусова, М.И. Федотова. – М.: Медицина, 1983. – 153 с.
 39. Горобец, Т.Н. Стресс и стрессообразующие факторы в характеристике, определении и «уничтожении» человека / Т.Н. Горобец, О.И. Жданов // Мир психологии. – 2008. – № 4. – С.45.
 40. Гуляева, Н.В. Перекисное окисление липидов в мозге при адаптации к стрессу: автореф. дис. ...д-ра. биол. наук: 14.00.16 / Наталья Валерьевна Гуляева. – М., 1989. – 30 с.
 41. Данилова, И.Г. Участие системы крови в адаптации организма к экстремальным факторам определяется как природой воздействия, так и состоянием кроветворной ткани / И.Г. Данилова, М.Н. Сумин, Б.Г. Юшков и др. // Рос. физиол. журн. – 2004. – № 10. – С.1193–1202.
 42. Долгушина, А.И. Функциональная активность нейтрофилов, оксид азота и перекисное окисление липидов у больных с атеросклерозом в бассейне брюшной аорты / А.И. Долгушина, И.А. Волчегорский, И.И. Шапошник // Рос.

- иммунол. журн. – 2011. – № 2. – С.170
43. Егоренкова, Л.А. Роль антиоксидантов в профилактике токсического воздействия активных форм кислорода в коже / Л.А. Егоренкова, И.Г. Диковицкая, М.И. Багаева, И.М. Корсунская // Клиническая дерматология и венерология. – 2011. – № 4. – С.75.
 44. Ельский, В.Н. Оксидативный стресс при синдроме длительного раздавливания и его патогенетическая коррекция нанопрепаратом липосом // В.Н. Ельский, С.В. Зяблицев, С.В. Колесникова и др. // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т.15, № 3. – С.110.
 45. Жумаева, Г.А. Особенности обмена микроэлементов у пожилых / Г.А. Жумаева, Г.Д. Жарылкасымова, В.З. Жалолова // Врач-аспирант. – 2007. – Т.18, № 3. – С.182.
 46. Журавлев, А.И. Спонтанная сверхслабая биохемилюминесценция – основа квантовой биологии / А.И. Журавлев // Успехи совр. биологии. – 1991. – Т.111, вып.1. – С. 144–153.
 47. Журавлев, Л.В. Печень и возраст: взгляд на проблему врача–терапевта / Л.В. Журавлева, О.В. Лахно, О.И. Цивенко // Пробл. старения и долголетия. – 2012. - Т.21, № 3. – С. 316 – 327
 48. Замб르지цкий, О.Н. Особенности проявления синдрома эмоционального выгорания у студентов-медиков / О.Н. Замб르지цкий, М.В. Катковская // Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. – Минск, 2009. – С.300–303.
 49. Занозина, О.В. Окислительная модификация белков в плазме крови больных сахарным диабетом типа 2 в зависимости от степени компенсации углеводного обмена и длительности заболевания / О.В. Занозина, Т.Г. Щербатюк, Н.Н. Боровков // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П.Павлова. – 2012. – № 12. – С.111.
 50. Звягинцева, Т.В. Влияние синтетического ингибитора матричных металлопротеиназ доксициклина на состояние процессов ПРО и антиоксидантной системы при лечении ожоговых ран в эксперименте / Т.В. Звягинцева, А.В. Александрова // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2012. – Т.55, № 2. – С.5.
 51. Зинченко, В.П. Внутриклеточная сигнализация: [электр. ресурс] / В.П. Зинченко, Л.П. Долгачева. – Пушкино: Электр. изд-во «Аналит.

- микроскопия», 2003. – 84 с. – Режим доступа: <http://cam.psn.ru>.
52. Зубова, С.Г. TOR-центрическая концепция регуляции митогенных, метаболических и энергетических сигнальных путей в клетке / С.Г. Зубова, Ж.В. Шитикова, Т.В. Поспелова // Цитология. – 2012. – Т.54, № 8. – С.589.
 53. Идова, Г.В. Нейроимунные взаимодействия при психоэмоциональном напряжении (экспериментальное исследование) / Г.В. Идова, Е.Л. Альперина, М.А. Чейдо и др. // Бюлл. СО РАМН. – 2010. – Т.30, № 4. – С.31–37.
 54. Извекова, В.А. Липиды мембран и функции иммунокомпетентных клеток в норме и патологии / В.А. Извекова // Успехи совр. биологии. – 1991. – Т.111, № 4. – С. 577.
 55. Иззати-Заде, К.Ф. Морфометрический анализ гранул серотонина тромбоцитов при мигрени / К.Ф. Иззати-Заде, В.А. Четвертных, А.А. Шутов // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. – 2011. – № 10. – С.58–61.
 56. Иллариошкин, С.Н. Антиоксиданты и свободные радикалы: вечная проблема и новые пути ее решения / С.Н. Иллариошкин // Формула здоровья. Нервы. – 2011. – № 1–2. – С.7.
 57. Каган, В.Е. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов / В.Е. Каган, Орлов О. Н., Прилипко Л. Л. // Итоги науки и техники. – 1986. – Сер. Биофизика. - Т.18. – С.1.
 58. Калиман, П.А. Экстремальные факторы внешней среды и старение организма / П.А. Калиман, Н.И. Буланкина, Г.В. Ганусова и др. // Цитология. – 1997. – Т.39, № 6. – С. 475.
 59. Камышников, В.С. Справочник по клинко- биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников. – СПб.: Мед. пресс-информ, 2004. – 920с.
 60. Кармен, Н.Б. Окислительный стресс в формировании гипоксии при тяжелой бронхиальной астме / Н.Б. Кармен, М.А. Абдуллаева, Л.В. Токарева // Пульмонология.– 2011. – Т.12. – С.665.
 61. Карпищенко, А.И. Медицинские лабораторные технологии / А.И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 2002. – 600с.
 62. Кассиль, Г.Н. Внутренняя среда организма / Г.Н.Кассиль. – М.: Наука. – 1983. – 277с.

63. Катикова, О.Ю. Особенности витаминного статуса у больных с заболеваниями печени различной этиологии. Возможности витаминотерапии / О.Ю. Катикова, Е.В. Ших // Рос. жур. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2009. – № 3. – С.21.
64. Кашуро, В.А. Патогенетическое и диагностическое значение системы глутатиона в оценке цитотоксического действия противоопухолевых препаратов: автореф. дис. ...д-ра. мед. наук: 14.00.16 / Вадим Анатольевич Кашуро. – СПб., 2009. – 45с.
65. Киричек, Л.Т. Стресспротекторы в коррекции воспаления слизистой оболочки полости рта / Л.Т. Киричек, Р.О. Коральчук // Международный медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С. 101.
66. Клебанов, Г.И. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов / Г.И. Клебанов // Лабораторное дело. – 1988. – № 5. – С. 59–62.
67. Коваленко, В.Н. Воспаление и оксидативный стресс в кардиоваскулярной патологии / В. Н. Коваленко, Т. В. Талаева, В. В. Братусь // Журнал НАМН України. – 2012. – № 4. – С. 461.
68. Козак, М.В. Возрастные изменения осмотической резистентности эритроцитов / М.В. Козак // Вестник Нижегородского университета. – 2010. – № 2. – С.648.
69. Козак, М.В. Особенности функционирования гипоталамо-гипофизарно-репродуктивной системы на этапах онтогенеза и в условиях применения геропротекторов: автореф. дис. ...д-ра. биол. наук: 03.03.01 / Михаил Владимирович Козак. – Астрахань, 2010. – 37 с.
70. Колесников, С.И. Окислительный стресс как патогенетическое звено острого отравления этанолом и его коррекция хелатным соединением цинка / С.И. Колесников, А.В. Машанов, Б.Я. Власов и др. // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – Т.83, № 1. – С.115–119.
71. Колесникова, Л.И. Антиоксидантный потенциал крови у мужчин с обструктивными нарушениями дыхания во время сна / Л.И. Колесникова, И.М. Мадаева, Н.В. Семенова, Б.Я. Власов // Бюлл. эксперимент. биологии и медицины. – 2012. – № 12. – С.695.
72. Кольтвер, В.К. Свободные радикалы, антиоксиданты и старение: от химии к

- системной теории надежности / В.К. Кольтвер // Ускоренное старение: механизмы, диагностика, профилактика: тез. междунар. научно–практ. конф.. – Киев, 2012. – С.26.
73. Коркина, Л.Г. Сравнительная характеристика оксидативного стресса при некоторых наследственных заболеваниях, отличающихся предрасположенностью к злокачественным новообразованиям и раннему старению / Л.Г. Коркина, П.Е. Трахтман, Дж. Пагано // Вестн. Рос. АМН. – 1998. – № 7. – С.51.
 74. Коркушко, О.В. Возрастные изменения реологических свойств крови и состояния эндотелиальной функции микроциркуляторного сосудистого русла / О.В. Коркушко, Г.В. Дужак // Пробл. старения и долголетия. – 2011. – Т.20, № 1. – С.35–52.
 75. Коркушко, О.В. Резервные возможности основных функций сердечно-сосудистой системы при старении (обзор литературы и собственных исследований) / О.В. Коркушко, Ю.Т. Ярошенко // Биология старения. Пробл. старения и долголетия. – 2012. – Т.21, № 2. – С.119.
 76. Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова и др. // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С.16–19.
 77. Кост Е.А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Е.А. Кост. – М.: Медицина, 1975. – 360с.
 78. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // Вопр. мед. химии. – 1990. – № 2. – С.88–91.
 79. Кочетов, А.Г. Методы статистической обработки медицинских данных: мет. рек. для ординаторов и аспирантов мед. учеб. заведений, науч. работников / А.Г. Кочетов, О.В. Лянг, В.П. Масенко и др. – М.: РКНПК, 2012. – 320с.
 80. Кротенко, Н.В. Нарушение биохимических показателей периферической крови у пациентов с рассеянным склерозом / Н.В. Кротенко, В.М. Алифирова, С.А. Иванова // Бюлл. сибирской медицины. – 2008. – Прил. 1. – С.238.
 81. Кротенко, Н.М. Показатели окислительного стресса и эндогенной интоксикации в периферической крови у больных с экзогенно-

- органическими расстройствами в динамике фармакотерапии / Н.М. Кротенко, А.С.Бойко, Е.М. Епанчинцева и др. // Бюлл. сибирской мед. – 2012. – № 1. – С.178–185.
82. Крутько, В.Н. Эффекты трансфер-фактора на биомаркеры старения в эксперименте и клинике / В.Н. Крутько, М.А. Гаврилов, В.И. Донцов, И.В. Мальцева // Вестник восстановительной медицины. – 2012. – № 3. – С. 53.
 83. Кузнецов, А.Н. Роль окислительного стресса в прогрессировании атеросклероза у больных ишемической болезнью сердца в сочетании с хронической обструктивной болезнью легких / А.Н. Кузнецов, Н.Ю. Григорьева, Е.Г. Шарабрин, и др. // Клиническая медицина. – 2011. – № 2. – С.69.
 84. Кузнецов, С.Л. Стресс и нейроэндокринная система: современные морфофункциональные аспекты / С.Л. Кузнецов, М.Ю. Капитонова, Ю.В. Дегтярь, В.Л. Загребин // Вестник ВГМУ. – 2008. – № 2. – С.10.
 85. Кузнецова, Э.Э. Микросомальное окисление в физиологических и патологических процессах / Э.Э. Кузнецова, В.Г. Горохова, А.С. Сергеева и др. // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – Т.56, № 4. – С.170.
 86. Кузьменко, В.В., Доброкачественная гиперплазия предстательной железы / В.В Кузьменко, М.В. Кочетов, Б.В. Семенов. – Воронеж: ВГУ, 2008. – 105с.
 87. Кулигин, А.В. Изменения процессов перекисного окисления липидов у больных в коматозном состоянии / А. В. Кулигин, И.Г. Жданов // Вестник Волгоград. ГМУ. – 2005. – № 2. – С.59.
 88. Купреева, М.С. Оценка состояния красной крови при желчном перитоните / М. С. Купреева, Э. А. Петросян, А. А. Сухинин, О. А. Терещенко // Бюлл. Волгоградского науч. центра РАМН. – 2008. – № 2. – С.49.
 89. Кургушев, А.Ю. Характер вегетативных и гормонально–метаболических изменений / А.Ю. Кургушев, А.В. Лопатин, Е.В. Неудахин // Вестник новых мед. технологий. – 2012. – № 1. – С.20–23.
 90. Кучин, А.В. Антиоксиданты: химия и применение / А.В. Кучин, И.Ю. Чукчиева // Вестник УрО РАН. – 2011. – № 3. – С.43.
 91. Ланкин, В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях / В.З. Ланкин, А.К. Тизазе, Ю.Н. Беленков. – М., 2001. – 78 с.
 92. Ланкин, В.З. Ферментативное перекисное окисление липидов / В.З. Ланкин //

- Укр. биохим. журн. – 1984. – Т.56, № 3. – С. 317.
93. Ловцова, Л.В. Органотропность изменений показателей перекисного окисления липидов при введении препаратов двухвалентного железа в эксперименте / Л.В. Ловцова, Т.О. Чуева, А.В. Дворников // Современные технологии в медицине. – 2011. – № 1. – С.15.
 94. Логинова, В.М. Влияние аторвастатина на липиды сыворотки крови мышей при экспериментальной липемии / В.М. Логинова, Ф.В. Тузиков, Н.А. Тузикова и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2011. – №2. – С.133.
 95. Лукаш, В.А. Возрастные особенности пероксидного окисления липидов в субклеточных фракциях гепатоцитов при регенерации печени в условиях стресса: дис. ...канд. биол. наук: 03.00.04 / Вячеслав Александрович Лукаш. – Екатеринбург, 2008. – 133 с.
 96. Lupinskaya, Z.A. Endothelium. Function and dysfunction / Z.A. Lupinskaya, A.G. Zarifyan, T.I. Gurovich and др. – Бишкек: КРСУ, 2008. – 373с.
 97. Мажитова, М.В. Возрастные и половые особенности свободнорадикальных процессов и антиоксидантной защиты плазмы крови белых крыс / М.В. Можитова, Д.Д. Теплый // Естественные науки. – 2010. – № 1. – С.79.
 98. Мальцев, Г.Ю. Методы определения содержания глутатиона и активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / Г.Ю. Мальцев, Н.В. Тышко // Гигиена и санитария. – 2002. – № 2. – С.69–72.
 99. Мамылина, Н.В. Адаптационно-компенсаторные реакции в системе эритронов при экспериментальном эмоционально-болевым стрессе: автореф. дис. ...д-ра. биол. наук: 03.01.01 / Наталья Владимировна Мамылина. – Челябинск, 2012. – 45с.
 100. Марачев, А.Г. Взаимосвязь процессов эритропоэза, эритродиереза и перекисного окисления липидов мембран эритроцитов / А. Г Марачев, Г.Н. Корнев, Г.Н. Дегтева и др. // Вестн. АМН СССР. – 1983. – № 11. – С.65.
 101. Меерсон, Ф.З. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам / Ф.З. Меерсон, М.Г. Пшенникова. – М.: Медицина, 1988. – 286 с.
 102. Меерсон, Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика / Ф.З. Меерсон. – М.: Наука, 1981. – 278 с.
 103. Меерсон, Ф.З. Роль цитоплазматических факторов в постстрессовых изменениях синтеза РНК в сердце и печени / Ф.З. Меерсон, М.П. Явич //

Вопр. мед. химии. –1987. – № 2. – С.90–96.

104. Меерсон, Ф.З. Сравнительная оценка антиаритмической эффективности антиоксиданта ионола (дибунола) при аритмогенной форме нейроциркуляторной дистонии и стабильной стенокардии напряжения / Ф.З. Меерсон, И.М. Корочкин, О.Л. Барабаш // Сов. мед. – 1990. – № 3. – С.67–70.
105. Меньшиков, В.В. Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меньшиков. – М.: Медицина, 1987. – 368с.
106. Меркулов, Г.А. Курс патогистологической техники // Г.А. Меркулов. – М.: Медицина, 1969. – 424с.
107. Мещанинов, В.Н. Влияние L-аргинина на биологический возраст и ПОЛ у пациентов зрелого возраста с полиорганной патологией / В.Н. Мещанинов, И.В. Вечкаева, А.П. Ястребов // Госпитальный вестник. – 2008. – № 1–2. – С.24.
108. Мещанинов, В.Н. Состояние перекисного окисления липидов системы крови в процессах возрастной инволюции организма и в условиях воздействия экстремальных факторов : дис. ...д-ра мед. наук: 14.00.16 / Виктор Николаевич Мещанинов. – Екатеринбург, 1999. – 286 с.
109. Минвалеев, Р.С. Сравнение скорости изменения липидного профиля сыворотки крови человека при подъеме на высоту среднегорья / Р.С. Минвалеев // Физиология человека. – 2011. – № 3. – С.103.
110. Мирошниченко, Т.И. Метаболизм эритроцитов при различной степени тяжести гестоза: [электр. ресурс] / Т.И. Мирошниченко, А.А. Конопля, Н.С. Воронцова // Вестн. новых медицинских технологий. – 2013. – № 1. – Режим доступа: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2013-1/4097.pdf>
111. Моришима, Ч. Подавление силимарином пролиферации Т-лимфоцитов и образования цитокинов in vitro при гепатите С / Ч. Моришима, М.С. Шухарт, Ч.С. Ванг и др. // Клиническая гастроэнтерология и гепатология: рус. изд. – 2011. – Т.4, № 1. – С.12–22.
112. Москалев, А.А. Роль генов транскрипционного фактора dFOXO, dSIR2 и HSP70 в изменении продолжительности жизни drosophila melanogaster при различных режимах освещения / А.А. Москалев, О.А. Малышева // Экологическая генетика. – 2010. – Т.8, № 3. – С.67.

113. Москалев, А.А. Старение и гены / А.А. Москалев. – СПб.: Наука, 2008. – 358 с.
114. Мохорт, Т.В. Альфа-липоевая кислота: полифакторное влияние и обоснование возможностей использования при сахарном диабете / Т.В. Мохорт // Медицинские новости. – 2011. – № 3. – С.67–69.
115. Нагорнев, С.Н. Фармакологическая коррекция процесса липопероксидации при гипоксии и возможность повышения высотной устойчивости человека с помощью препаратов метаболического типа действия / С.Н. Нагорнев, С.И. Сытник, И.П. Боровицкий // Вестн. Рос. АМН. – 1996. – № 7. – С.53–60.
116. Назарян, Н.С. Субклеточные нитритэргический механизмы отделов кортиколимбической системы головного мозга, крови и костного мозга при индуцированной хроническим стрессом и депрессии: дис. ...канд. биол. наук: 03.01.04 / Нарине Самвеловна Назарян. – Ереван, 2011. – 149с.
117. Нгуен, Т.Ч. Исследование структурного состояния мембран эритроцитов больных ишемической болезнью сердца старших возрастов / Т.Ч. Нгуен // Фундаментальные исследования. Медицинские науки. – 2012. – № 2. – С.97.
118. Несов, А.В. Активные формы кислорода в гибели клеток растений: роль митохондрий, NADPH-оксидазы плазматической мембраны и апопластиной пероксидазы: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.01.05 / Артем Владимирович Несов. – М., 2013. – 24с.
119. Нестеров, Ю.В. Стресс-реактивность разновозрастных беспородных белых крыс на модели острого эмоционально-болевого стресса / Ю.В. Нестеров, Д.Л. Теплый, Ю.В. Алтуфьев, и др. // Естественные науки. – 2012. – № 1. – С.156.
120. Николаева-Балл, Д.Р. Состояние адаптационных механизмов у женщин с метаболическим синдромом и гестозом в III триместре беременности / Д.Р. Николаева-Балл, Н.И. Кан // Фармакология. – 2012. – Т.13. – С.803.
121. Никонов, В.В. Медицина неотложных состояний. Избранные клинические лекции / В.В. Никонов, А.Э. Феськов. – Донецк: Заславский А.Ю., 2008. – 504с.
122. Обухова, Л.К. Антиоксиданты и геропротекторы: идентичны ли эти понятия? / Л.К. Обухова // Клин. геронтология. – 2002. – Т.8, № 5. – С.186.
123. Овсепян, Л.М. Исследование окислительной модификации белков и липидов при экспериментальном синдроме болезни Паркинсона / Л.М. Овсепян, Г.С. Казарян, М.В. Львов и др. // Биол. журн. Армении. – 2012. – Т.64, № 2. –

С.80.

124. Овсепян, Л.М. Исследования перекисного окисления белков и липидов при острой гипоксии / Л.М. Овсепян, Г.В. Захарян, Г.С. Газарян // Биол. журн. Армении. – 2010. – № 3. – С.42.
125. Огай, М.А. Антиоксидантный и мембраностабилизирующий эффект таурина / М.А. Огай, Э.Ф. Степанова, Д.Б. Холодов, В.А. Николаевский // Вестник Воронежского ГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2011. – № 1. – С.186.
126. Орехов, А.Н. Атеросклероз. Молекулярно-клеточные механизмы атерогенеза человека; атеросклеротические механизмы / А.Н. Орехов. – Saarbrücken, Германия: Palmarium Academic Publishing, 2013. – 544 с.
127. Оробец, В.А. Стресс и его коррекция у животных: учеб. пособие / В.А. Оробец, И.И. Некрасова, О.Г. Сапожникова. – Ставрополь: Ставропол. ГАУ. – 2010. – 52 с.
128. Осипов, А.Н. Медицинская биофизика: роль кафедры общей и медицинской биофизики в ее становлении и развитии / А.Н. Осипов, Ю.А. Владимиров, Ю.О. Теселкин. // Вестник РГМУ. – 2012. – № 4. – С.5.
129. Павлов, А.С. Стратегии терморегулирования при различных видах стресса / А.С. Павлов. – Донецк: Донбасс, 2011. – 112 с.
130. Падалко, В.И. Влияние 2,4–динитрофенола на интенсивность окислительных процессов в печени крыс в длительном эксперименте / В.И. Падалко, И.С. Леонова, Е.В. Козлова // Успехи геронтологии. – 2010. – Т.23, № 1. – С. 98–103.
131. Перцов, С.С. Интенсивность окислительных и антиоксидантных процессов в головном мозге крыс с разными параметрами поведения при острой стрессорной нагрузке / С.С. Перцов, Е.В. Коплик, Л.С. Калиниченко // Бюлл. экспер. биол. мед. – 2011. – Т.152, № 7. – С.4–8.
132. Пикалова, Л.В. Генопротективные эффекты мелатонина при химических и радиационных воздействиях: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.01.01 / Лидия Васильевна Пикалова. – СПб., 2012. – 23 с.
133. Подгорнова, Н.А. Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы защиты как прогностический критерий тяжести течения климактерического синдрома / Н.А. Подгорнова, Г.О. Гречканев // Российский вестник акушера–гинеколога. – 2010. – № 2. – С.13.

134. Подковкин, В.Г. Изменение показателей обмена коллагена при эмоциональном стрессе / В.Г. Подковкин, Д.Г. Иванов // Вестник ОГУ. – 2010. – Т.108, № 2. – С.124–128.
135. Подрядина, Г.В. Стресс и патология / Г.В. Подрядина. – Москва: РГМУ, 2009. – 24 с.
136. Прайор, У. Роль свободнорадикальных реакций в биологических системах / У. Прайор // Свободные радикалы в биологии. – М.: Мир, 1979. – Т.1. – С. 13
137. Пристом, А.М. Оксидативный стресс и сердечнососудистые заболевания / А.М. Пристом, М. Бенхамед // Лечеб. дело. – 2012. – Т.24, № 2. – С.19–23.
138. Пупышев, А.Б. Пермеабиллизация лизосомальных мембран как апоптогенный фактор / А.Б. Пупышев // Цитология. – 2011. – Т.53, № 4. – С.295–312.
139. Путилина, М.В. Дисфункция эндотелия и применения антиоксидантов при цереброваскулярных заболеваниях / М.В. Путилина // Неврология. – 2010. – № 1. – С.15–17.
140. Пухальский, А.Л. Генетическая гетерогенность синтеза белков теплового шока, как фактор определяющий устойчивость организма млекопитающих к действию стрессовых агентов // А.Л. Пухальский, Г.В. Шамарина, И.В. Капустин и др. // Цитология. – 2010. – Т.52, № 12. – С.1016–1023.
141. Реброва, Т.Ю. Особенности системы антиоксидантов при постинфарктном ремоделировании миокарда у животных разного возраста / Т.Ю. Реброва, О.Д. Путрова, С.А. Афанасьев // Естественные науки. – 2012. – Т.38, № 1. – С.197–200.
142. Романова, Л.А., Метод определения гидроперекисей липидов с помощью тиоцианата аммония / Л.А. Романова, И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С.65–66.
143. Рудаков, А.Л. Стресс, стрессоустойчивость и саногенная рефлексия в спорте: монография / А.Л. Рудаков. – Красноярск, 2011. – 190 с.
144. Рутковская, Ж.А., Влияние гипероксии на состояние антиоксидантной системы эритроцитов у новорожденных морских свинок / Ж.А. Рутковская, И.Л. Котович, А.Д. Таганович // Весці НАНБ, сер. мед. Навук. – 2011. – N 3. – С.50.
145. Садовникова, И.П. Изменение иммунного ответа при старении и влияние на

- него геропротекторов-антиоксидантов / И.П. Садовникова // Различные аспекты биологических систем: докл. МОИП. – 1986. – С.53–56.
146. Самсонова, Е.Н. Реакция клеток костного мозга крыс при действии общей гипертермии / Е.Н. Самсонова, Н.В. Долотина, О.Н. Логачева // Бюлл. СО РАМН. – 2011. — Т.31, № 1. – С.40–45.
 147. Селье, Г. Стресс без дистресса / Г. Селье. – М.: Прогресс, 1982. – 68 с.
 148. Семенков, В.Ф. Стресс и старение человека / В.Ф. Семенков, В.И. Карандашов, Т.А. Михайлова // Вестник РАЕН. – 2011. – № 4. – С.72.
 149. Сиверина, О.Б. Метод количественного определения церулоплазмينا / О.Б. Сиверина, В.В. Басевич, Р.В. Басова // Лаб. дело. – 1986. – №10. – С.618–621.
 150. Собенин, И.А. Клеточные модели для поиска веществ, способствующих обратному транспорту холестерина / И.А. Собенин, А.Н. Орехов, В.А. Орехова и др. // Биомедицинский журнал. – 2011. – № 12. – С.1134
 151. Солодовников, О.Н. Кислородный взрыв" нейтрофильных лейкоцитов в патогенезе воспалительной реакции при гнойных инфекциях у детей / О.Н. Солодовникова, В.П. Молочный // Дальневосточный медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С.118.
 152. Стальная, И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С.63–64.
 153. Стальная, И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – М., 1977. – С.66–68.
 154. Стрекалова, Т.В. Депрессивноподобные состояния и сон у лабораторных мышей / Т.В. Стрекалова, Р. Сеспульо, В.М. Ковальзон // Журн. высш. нервн. деятельности. – 2008. – Т.58, № 6. – С.728–733.
 155. Судаков, К.В. Системные механизмы саморегуляции здоровья / К.В. Судаков // Вестн. Международной академии наук. Русская секция. – 2012. – № 2. – С.13.
 156. Судаков, К.В. Системные основы эмоционального стресса / К.В. Судаков, П.Е. Умрюхин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 103 с.
 157. Сыровая, А.О. Биологическая роль свободных радикалов в развитии патологических состояний / А.О. Сыровая, Ф.С. Леонтьева, И.В. Новикова и др. // Международный медицинский журнал. – 2012. – № 3. – С.98.

158. Тагашева, Р.Г. Производные индола с пространственно затрудненными фенольными фрагментами: синтез, строение, свойства: автореф. дис. ...канд. хим. наук: 02.00.03 / Роза Геннадьевна Тагашева. – Казань, 2009. – 19с.
159. Теплый, Д.Д. Особенности морфологических показателей эритроцитов белых крыс на раннем и позднем этапах онтогенеза / Д.Д. Теплый, Ю.В. Нестеров // Естественные науки. – 2011. – Т.34, № 1. – С.138–143.
160. Терешина, Е.В. Метаболические нарушения – основа зависимых от возраста заболеваний или старения организма? Состояние проблемы. / Е.В. Терёшина // Успехи геронтологии. – 2009. – Т.22, № 1. – С.129–138.
161. Терешина, Е.В. Роль жирных кислот в развитии возрастного окислительного стресса. Гипотеза / Е.В. Терешина // Успехи геронтологии. – 2007. – № 1. – С. 59.
162. Титов, В.Ю. Особенности метаболизма оксида азота в норме и при патологии / В.Ю. Титов, М.В. Крейнина, В.А. Петров и др. // Вестник РГМУ. – 2012. – № 4. – С.11.
163. Ткаченко, А.Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов / А.Г. Ткаченко. – Екатеринбург: УрО РАН, 2012. – 267 с.
164. Тодоров, И.Н. Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологий, процессе старения и апоптоза / И.Н. Тодоров // Журнал Российского хим. об-ва им. Д.И. Менделеева. – 2007. – № 1. – С.93–106.
165. Трухачева, Е.П. Значение никотиновой кислоты в современной кардиологии / Е.П. Трухачева, М.В. Ежов // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2011. – № 7. – С.365–373.
166. Тужилин, С.А. Метод определения фосфолипазы А в сыворотке крови / С.А. Тужилин, А.И. Салуэнья // Лаб. дело. – 1975. – № 6. – С.334–335.
167. Тукаев, Р.Д. Триггерные механизмы биологического и психического стресса в соотношении с диатез-стрессовыми моделями психиатрии / Р.Д. Тукаев // Социальная и клиническая психиатрия. – 2012. – Т.22, № 2. – С.69–77.
168. Умрюхин, А.Е. Органы–маркеры стресса и кортикостерон в крови после иммобилизации у поведенчески активных и пассивных крыс на фоне иммунизации конъюгатом глутамата с бычьим сывороточным альбумином / А.Е. Умрюхин, С.В. Сотников, Н.Ю. Чекмарева и др. // Бюлл. эксперимент.

- биол. и мед. – 2014. – Т.158, № 6. – С.420–427.
169. Федоров, В. А. Ресурсы организма. Новый подход к выявлению причин возникновения заболеваний и методам их лечения / В.А. Федоров, А.Ю. Ковеленов, Г.Н. Логинов, Ф.Н. Рябчук. – СПб.: СпецЛит, 2012. – 63с.
 170. Филипцова, Г.Г. Роль простаноидов в регуляции физиологических процессов в растениях / Г.Г. Филипцова, Е.М. Лапковская, В.М. Юрин // Труды БГУ. – 2011. – Т.6, Ч.2. – С.59–64.
 171. Фролькис, В.В. Старение мозга / Фролькис В.В. – Л.: Наука, 1991. – 277 с.
 172. Хавинсон, В.Х. Регуляторные пептиды и гомеостаз / В.Х. Хавинсон, Т.В. Кветная // Журнал Российского хим. об-ва им. Д.И. Менделеева. – 2005. – Т.49, № 1. – С.112–117.
 173. Хидирова, Л.Д. Изменение баланса между активностью перекисного окисления липидов, антиокислительной защитой и содержанием железа у крыс при экспериментальном инфаркте миокарда / Л.Д. Хидирова // Экспериментальная фармакология. – 2010. – № 6. – С. 216–227.
 174. Черешнев, В.А. Экспериментальные модели в патологии / В.А. Черешнев, Ю.И. Шилов, М.В. Черешнева и др. – Пермь: Перм. гос. ун-т, 2011. – 267 с.
 175. Чижова, Г.В. Принципы терапии психоэмоциональных проявлений климактерического синдрома в период менопаузы / Г.В.Чижова, Т.П. Цветкова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2011. – № 3. – С. 1.
 176. Шадриков, В.Д. Введение в психологию: эмоции и чувства / В.Д. Шадриков. – М.: ЛОГОС, 2002. – 156с.
 177. Шарман, А. Научные основы качественного долголетия и антистарения / А. Шарман, Ж. Жумадилов. – Нью-Йорк: Mary Ann Liebert, Inc., 2011. – 184с.
 178. Швец, В.Н. Возрастные особенности накопления карбонилированных белков в субклеточных фракциях миокарда при иммобилизационном стрессе / В.Н. Швец // Ученые записки Таврического нац. университета им. В.И. Вернадского. – 2008. – Серия «Биология, химия». – Т.21, № 1. – С.169.
 179. Шишкин, А.Н. Гериатрия: учеб. пособие для студ. проф. учеб. заведений / А.Н. Шишкин, Н.Н. Петрова, Л.А. Слепых. – М.: Академия, 2008. – 192 с.
 180. Эмануэль, Н.М. Антиоксиданты и увеличение продолжительности жизни / Н.М. Эмануэль // Физиол. журнал. – 1984. – Т.30, № 1. – С.1–8.
 181. Эмирбеков, Э.З. Влияние многократного холодового стресса на

- интенсивность перекисного окисления липидов и антиоксислительную систему тканей / Э.З. Эмирбеков, С.П. Львова, А.Г. Гасангаджиева // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 1998. – Т.125, № 4. – С. 385–387.
182. Юшков, Б.Г. Система крови и экстремальные воздействия на организм / Б.Г. Юшков, В.Г. Климин, М.В. Северин. – Екатеринбург: УрО РАН, 1999. – 201 с.
183. Юшков, Б.Г. Сосуды костного мозга и регуляция кроветворения: монография // Б.Г. Юшков, В.Г. Климин, А.И. Кузьмин. – Екатеринбург: УрО РАН, 2004. – 148с.
184. Ярыгин, В.Н. Анализ взаимодействия центральных и периферических норадренергических структур в онтогенезе крыс / В.Н. Ярыгин, Л.В. Бибаева, И. Е. Малинина // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1997. – Т.124, № 11. – С.579–582.
185. Ястребов, А.П. Старение, перекисное окисление липидов и биовозраст / А.П. Ястребов, В.Н. Мещанинов. – Екатеринбург: Урал. следопыт, 2005. – 220 с.
186. Яхно, Т.А. Агрегатное состояние и кооперативные реакции компонентов цельной крови в норме и патологии: дис. ...д-ра. биол. наук: 03.01.02 / Татьяна Анатольевна Яхно. – Нижний Новгород, 2011. – 317с.
187. Ahmad, A. Restraint stress-induced central monoaminergic & oxidative changes in rats & their prevention by novel *Ocimum sanctum* compounds / A. Ahmad, N. Rasheed, K. Chand, et al. // Indian J. Med. Res. – 2012. – Vol.135, № 4. – P.548–554.
188. Amireault, P. Serotonin is a key factor for mouse red blood cell survival / P. Amireault, E. Bayard, J.M. Launay // PLoS One. – 2013. – Vol.8, № 12. – P.e83010.
189. Andersen, H. R. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes / H.R. Andersen, J.B. Nielsen, F. Nielsen, et al. // Clin. Chem. – 1997. – Vol.43, № 4. – P.562–568.
190. Anderson, E.J. Mitochondria as a Source and Target of Lipid Peroxidation Products in Healthy and Diseased Heart / E.J. Anderson, L.A. Katunga, M.S. Willis // Clin. Exp. Pharmacol Physiol. – 2012. – Vol.39, № 2. – P.56–71.

191. Ando, K. Evidence for accumulation of lipid hydroperoxides during the aging of human red blood cells in the circulation / K. Ando, M. Beppu, K. Kikugawa // *Biol. Pharm. Bull.* – 1995. – Vol.18, № 5. – P.659–563.
192. Baranski, G.M. Beta blockade protection of bone marrow following trauma: the role of G-CSF / G.M. Baranski, M.D. Offin, Z.C. Sifri, et al. // *J. Surg. Res.* – 2011. – Vol.170, № 2. – P.325–331.
193. Battal, D. Possible role of selective serotonin reuptake inhibitor sertraline on oxidative stress responses / D. Battal, S. Yalin, E.D. Eker // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2014. – Vol.18, № 4. – P.477–484.
194. Belluzzi, E. Human SOD2 Modification by Dopamine Quinones Affects Enzymatic Activity by Promoting Its Aggregation: Possible Implications for Parkinson's Disease / E. Belluzzi, M. Bisaglia, E. Lazzarini, et al. // *PLoS One.* – 2012. – Vol.7, № 6. – P.e38026.
195. Blanchet, M.R. Modulation of eosinophil activation in vitro by a nicotinic receptor agonist / M.R. Blanchet, A. Langlois, E. Israel-Assayag, et al. // *Journal of leukocyte biology.* – 2007. – Vol.81. – P.1245–1251.
196. Blann, A. Blood tests and age-related changes in older people / A. Blann // *Nurs. Times.* – 2014. – Vol.110, № 7. – P.22–23.
197. Boman, B L-tryptophan: a rational anti-depressant and a natural hypnotic? / Boman B // *Aust. N Z J Psychiatry.* – 1986. – Vol.22, № 1. – P.83–97.
198. Braidă, D. Role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) on learning and memory in zebrafish / D. Braidă, L. Ponzoni, R. Martucci // *Psychopharmacology (Berl).* – 2014. – Vol.231, № 9. – P.1975–1985.
199. Bremner, J.D. Traumatic stress: effects on the brain / J.D. Bremner // *Dialogues in clinical neuroscience.* – 2006. – Vol.8, № 4. – P.28–34.
200. Brezinová, V. Tryptophan and sleep / V. Brezinová, J. Loudon, I. Oswald // *Lancet.* – 1972. – Vol.7789, № 2. – P.1086–1087.
201. Cacanyiova, S. The role of oxidative stress in acetylcholine-induced relaxation of endothelium-denuded arteries / S. Cacanyiova, I. Dvinova, F. Kristek // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2013. – Vol.64, № 2. – P.241–247.
202. Calles-Escandyn, J. Basal fat oxidation decreases with aging in women / J. Calles-Escandyn, P. J. Arciero, A. W. Gardner et al. // *J. Appl. Physiol.* – 1995. – Vol.78, № 1. – P. 266.

203. Cangemi, R., Early decrease of oxidative stress by atorvastatin in hypercholesterolaemic patients: effect on circulating vitamin E / R. Cangemi, L. Loffredo, R. Carnevale, et al. // *European Heart Journal*. – 2008. – Vol.29. – P.54–62.
204. Carrasco, G.A. Neuroendocrine pharmacology of stress / G.A. Carrasco, L.D. Van de Kar // *Euro. J. of Pharm.* – 2003. – Vol.463. – P.235–272.
205. Carvalho, F.A. Acetylcholine and choline effects on erythrocyte nitrite and nitrate levels / F.A. Carvalho, R. Mesquita, J. Martins-Silva, et al. // *J. Appl. Toxicol.* – 2004. – Vol.24, № 6. – P.419–427.
206. Chang, E. Cholinergic activation of hematopoietic stem cells: role in tobacco-related disease? / E. Chang, E.C. Forsberg, J. Wu, et al. // *Vascular Medicine*. – 2010. – Vol.15, № 5. – P.375–385.
207. Chen, H.J. Reactive nitrogen species contribute to the rapid onset of redox changes induced by acute immobilization stress in rats / H.J. Chen, J.G. Spiers, C. Sernia, et al. // *Stress*. – 2014. – № 6. – P.520–527.
208. Cho, H.J. Early life stress and inflammatory mechanisms of fatigue in the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study / H.J. Cho, J.E. Bower, C.I. Kiefe, et al. // *Brain Behav Immun*. – 2012. – Vol.26, № 6. – P.859–865.
209. Choi, H.R. Potential redox-sensitive Akt activation by dopamine activates Bad and promotes cell death in melanocytes / H.R. Choi, J.W. Shin, H.K. Lee, et al. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2010. – Vol.3, № 3. – P.219–224.
210. Christen, S. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases / S. Christen, E. Peterhans, R. Stocker // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1990. – Vol.87, № 7. – P.2506–2510.
211. Cooper, A.J. Tryptophan antidepressant «physiological sedative»: fact or fancy? / A.J. Cooper // *Psychopharmacology (Berl)*. – 1979. – Vol.61, № 1. – P.97–102.
212. Серкиз, Я.И. Хемилюминесценция крови в экспериментальной и клинической онкологии / Я.И. Серкиз, Е.Е. Чеботарев, В.А. Барабой. – Киев: Наук. думка, 1984. – 184 с.
213. Dai, D.F. Cardiac Aging: From Molecular Mechanisms to Significance in Human Health and Disease / D.F. Dai, T. Chen, S.C. Johnson, et al. // *Antioxid Redox Signal*. – 2012. – Vol.16, №12. – P.1492–1526.

214. Daviu, N. Comparison of the effects of single and daily repeated immobilization stress on resting activity and heterotypic sensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis / N. Daviu, C. Rabasa, R. Nadal, A. Armario // *Stress*. – 2014. – Vol.17, № 2. – P.176–185.
215. Della, R. F. Hemoglobin oxidative stress in cancer / R. F. Della, A. Granata, M. Broccio, et al. // *Anticancer Res.* – 1995. – Vol.15, № 5. – P. 2089.
216. Duncan, C. Age related changes in rat glutathione metabolism / C. Duncan, C. Bryan, R. Lawrence, et al. // *FASEB Journal*. – 1989. – Vol.3, № 3. – P.681.
217. Dussor, G. Serotonin, 5HT1 agonists, and migraine: new data, but old questions still not answered / G. Dussor // *Curr Opin Support Palliat Care*. – 2014. – № 2. – P.137–142.
218. Einsele, H. In vitro aging of red blood cells and lipid peroxidation / H. Einsele, M.R. Clemens, H. Remmer // *Arch. Toxicol.* – 1987. – Vol.60, № 1. – P.163–166.
219. Fernstrom, J.D. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain / J.D. Fernstrom, M.H. Fernstrom // *J. Nutr.* – Vol.137, № 6. – P.1539–1547.
220. Fleshner, M. Exercise and neuroendocrine regulation of antibody production: protective effect of physical activity on stress-induced suppression of the specific antibody response / M. Fleshner // *Int. J. Sports Med.* – 2000. – Suppl 21, Rev.1. – P.S14–S19.
221. Fornal, C. Hypnotic effect of tryptophan analog in rats / C. Fornal, W.J. Wojcik, M. Radulovacki // *Pharmacol Biochem. Behav.* – 1979. – Vol.11, № 3. – P.319–323.
222. Fukuwatari, T. Nutritional aspect of tryptophan metabolism / T. Fukuwatari, K. Shibata // *Int J Tryptophan Res.* – 2013. – № 6. – P.3–8.
223. Furuya, W.I. Differential modulation of sympathetic and respiratory activities by cholinergic mechanisms in the nucleus of the solitary tract in rats / W.I. Furuya, M. Bassi, J.V. Menani, et al. // *Exp Physio.* – 2014. – Vol.99, № 5. – P.743–758.
224. Gahring, L.C. Nicotinic receptor $\alpha 7$ expression identifies a novel hematopoietic progenitor lineage / L.C. Gahring, E.Y. Enioutina, E.J. Myers, et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol.8, № 3. – P.e57481.
225. Ganzel, B.L. Allostasis and the human brain: Integrating models of stress from the social and life sciences / B.L. Ganzel, P.A. Morris, E. Wethington // *Psychol.*

- Rev. – 2010. – Vol.117, № 1. – P.134–174.
226. Ganzel, B.L. Allostasis and the human brain: Integrating models of stress from the social and life sciences / B.L. Ganzel, P.A. Morris, E. Wethington // Psychol Rev. – 2010. – Vol.117, № 1. – P.134–174.
 227. Gayen, J.R. Role of Reactive Oxygen Species in Hyper-Adrenergic Hypertension: Biochemical, Physiological, and Pharmacological Evidence from Targeted Ablation of the Chromogranin A (*Chga*) Gene / J.R. Gayen, K. Zhang, S.P. RamachandraRao, et al. // Circ. Cardiovasc. Genet. – 2010. – Vol.3, № 5. – P.414–425.
 228. Ghosh, A. Neuroprotective Role of Nanoencapsulated Quercetin in Combating Ischemia-Reperfusion Induced Neuronal Damage in Young and Aged Rats / A. Ghosh, S. Sarkar, A.K. Mandal, et al. // PLoS One. – 2013. – Vol.8, № 4. – e57735.
 229. Gibbons, C.H. Experimental hypoglycemia is a human model of stress-induced hyperalgesia / C.H. Gibbons, G.K. Adler, I. Bonyhay // Pain. – 2012. – Vol.153, № 11. – P.2204–2209.
 230. Gilboa-Geffen, A. Stressing hematopoiesis and immunity: an acetylcholinesterase window into nervous and immune system interactions / A. Gilboa-Geffen, G. Hartmann, H. Soreq // Front mol. neurosci. – 2012. – Vol.5, № 30. – P.54–63.
 231. Goldstein, D.S. Catecholamines and stress / D.S. Goldstein // Endocrine regulations. – 2003. – Vol.37. – P.69–80.
 232. Goncharova, N.D. Stress Responsiveness of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis: Age-Related Features of the Vasopressinergic Regulation / N.D. Goncharova // Front. Endocrinol (Lausanne). – 2013. – Vol.4. – P.26–33.
 233. Gounder, S.S. Impaired Transcriptional Activity of Nrf2 in Age-Related Myocardial Oxidative Stress Is Reversible by Moderate Exercise Training / S.S. Gounder, S. Kannan, D. Devadoss, et al. // PLoS One. – 2012. – Vol.7, № 9. – e45697.
 234. Grewal, P. Screening methods to identify indole derivatives that protect against reactive oxygen species induced tryptophan oxidation in proteins / P. Grewal, M. Mallaney, K. Lau. et al. // Mol Pharm. – 2014. – Vol.11, № 4. – P.1259–1272.
 235. Gruver, A.L. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy / A.L. Gruver,

- G.D. Sempowski // J. Leukoc. Biol. – 2008. – Vol.84, № 4. – P.915–923.
236. Han, J. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death / J. Han, S.H. Back, J. Hur // Nat. Cell Biol. – 2013. – Vol.15, № 5. – P.481–490.
237. Hankin, B.L., Hypothalamic pituitary adrenal axis dysregulation in dysphoric children and adolescents: Cortisol reactivity to psychosocial stress from preschool through middle adolescence / B.L. Hankin, L.S. Badanes, S.E. Watamura, et al. // Biol Psychiatry. – 2010. – Vol.68, № 5. – P.484–490.
238. Harman, D. The aging process / D. Harman // Proc. Nat. Acad. Sci. USA Biol. Sci. – 1981. – Vol.78, № 11. – P. 7124 – 7128.
239. Hartmann, E. Effects of 6-hydroxydopamine on sleep in the rat / E. Hartmann, R. Chung, P.R. Draskoczy. et al. // Nature. – 1971. – Vol.233. – P.425–427.
240. Hartmann, E. The insomnia of 'sleeping in a strange place': effects of l-tryptophane / E. Hartmann, R. Elion // Psychopharmacology (Berl). – 1977. – Vol.53, № 2. – P.131–133.
241. Hasselmo, M.E. The role of acetylcholine in learning and memory / M.E. Hasselmo // Curr. Opin. Neurobiol. – 2006. – Vol.16, № 6. – P.710–715.
242. Hecker, J.G. Heat shock proteins as biomarkers for the rapid detection of brain and spinal cord ischemia: a review and comparison to other methods of detection in thoracic aneurysm repair / J.G. Hecker, M. McGarvey // Cell Stress Chaperones. – 2011. – Vol.16, № 2. – P.119–131.
243. Helbig, D. Changes occurring at the molecular level in aging skin and during wound healing after ablative fractional photothermolysis / D. Helbig, U. Paasch // Skin Research and Technology. – 2011. – № 17. – C.119.
244. Henderson, B. Proteotoxic stress and circulating cell stress proteins in the cardiovascular diseases / B. Henderson, A.G. Pockley // Cell Stress Chaperones. – 2012. – Vol.17, № 3. – P.303–311.
245. Henderson, B. Proteotoxic stress and circulating cell stress proteins in the cardiovascular diseases / B. Henderson, A.G. Pockley // Cell Stress Chaperones. – 2012. – Vol.17, № 3. – P.303–311.
246. Hirabayashi, Y. Radiation-induced, cell cycle-related gene expression in aging hematopoietic stem cells: enigma of their recovery / Y. Hirabayashi // Ann N Y Acad Sci. 2014. – Vol.131, № 1. – P.69–73.

247. HollanB, W.C. The synthesis of acetylcholine by human erythrocytes / W.C. HollanB, M.E. Greig // Arch. Biochem. Biophys. – 1952. – Vol.39, № 1. – C.77–79.
248. Honda, S. Relationships between the cellular glutathione level and in vitro life span of human diploid fibroblasts / S. Honda, M. Matsuo // Exp. Gerontol. – 1988. – Vol.23, № 2. – P. 81–86.
249. Horst, N.K. Impaired auditory discrimination learning following perinatal nicotine exposure or $\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor subunit deletion / N.K.Horst, C.J. Heath, N.M. Neugebauer // Behav. Brain Res. – 2012. – Vol.231, № 1. – P.170–180.
250. Horvath, S.J. Effects of racing on reticulocyte concentrations in Greyhounds / S.J. Horvath, C.G. Couto, K. Yant, et al. // Vet Clin Pathol. – 2013. – Vol.43, № 1. – P.15–23.
251. Hu, X. The effect of acetylcholine and atropine on proliferation and differentiation and mAChR1 expression of human SK-N-SH cells / X. Hu, J.X. Lu // Shi yan Sheng wu xue bao. – 2005. – Vol.38, № 4. – P.287–296.
252. Hundekari, J.C. Plasma Catecholamine's and Blood Pressure Changes after Prolonged Exposure to Stressful Stimuli (Heat) / J.C. Hundekari // Journal of Dental and Medical Sciences. – 2012. – Vol.1, № 5. – P.43–46.
253. Iuga, C. ROS Initiated Oxidation of Dopamine under Oxidative Stress Conditions in Aqueous and Lipidic Environments / C. Iuga, J.R. Alvarez-Idaboy, A. Vivier-Bunge // J. Phys. Chem. B. – 2011. – Vol.115, № 42. – P.12234–12246.
254. Jodko, K. Oxidative stress in the neurodegenerative diseases--potential antioxidant activity of catecholamines / K. Jodko, G. Litwinienko // Postepy Biochem. – 2010. – Vol.56, № 3. – P.248–259.
255. Jonathan, E.S. Post-traumatic stress disorder: the neurobiological impact of psychological trauma / J.E. Sherin, C.B. Nemeroff // Dialogues clin. neurosci. – 2011. – Vol.13, № 3. – P.263–278.
256. Khalil, D. Cholinergics, Airway Eosinophils and Asthma Exacerbation in the Elderly / D. Khalil, J. Hirota, P. Nair // The Indian journal of chest diseases & allied sciences. – 2011. – Vol.53. – P.59–61.
257. KirkPatrick, D.T. Detection of in vivo lipid peroxidation using the thiobarbituric acid assay for lipid hydroperoxides / D.T. KirkPatrick // J. Biochem. Toxicol. –

1986. – Vol.1, № 1. – P. 93–99.
258. Klugman, A. Antioxidant enzymatic activities in Alzheimer's disease: the relationship to acetylcholinesterase inhibitors / A. Klugman, D.P. Naughton, M. Isaac, et al. // *J Alzheimers Dis.* – 2012. – Vol.30, № 3. – P.467–474.
259. Kobayashi, K. Role of catecholamine signaling in brain and nervous system functions: new insights from mouse molecular genetic study / K. Kobayashi // *J. Investig. Dermatol Symp. Proc.* – 2001. – Vol.6, № 1. – P.115–121.
260. Kondo, Y. Role of TrkB expression in rat adrenal gland during acute immobilization stress / Y. Kondo, M. To, J. Saruta, et al. // *J. of Neurochemistry.* – 2013. – Vol.124, № 2. – P.224–232.
261. Koshoridze, N.I. Quantitative Alterations in the Products of Lipid Peroxidation under Stress / N.I. Koshoridze, K.O. Menabde, Z.T. Kuchukashvili, M.V.Chachua, M.D. Chipashvili // *Journal of stress physiology & biochemistry.* – 2010 – Vol.6, № 2. – P.5–12.
262. Koval, L.M. Nicotinic acetylcholine receptors alpha4beta2 and alpha7 regulate myelo- and erythropoiesis within the bone marrow / L.M. Koval, A.S. Zverkova, R. Grailhe, et al. // *Int. J. biochem. cell. biol.* – 2008. – Vol.40, № 5. – P.980–990.
263. Krymchantowski, A.V. Wine and headache / A.V. Krymchantowski, C. da Cunha Jevoux // *Headache.* – 2014. – Vol.54, № 6. – P.967–975.
264. Larauche, M. Stress and visceral pain: from animal models to clinical therapies / M. Larauche, A. Mulak, Y. Taché // *Exp. Neurol.* – 2012. – Vol.233, № 1. – P.49–67.
265. Lesniewski, L.A. B6D2F1 Mice Are a Suitable Model of Oxidative Stress–Mediated Impaired Endothelium-Dependent Dilation With Aging / L.A. Lesniewski, M.L. Connell, J.R. Durrant, et al. // *J. gerontol. a biol. Sci: Med. sci.* – 2009. – Vol.64A, № 1. – P.9–20.
266. Levitan, R.D. Preliminary randomized double-blind placebo-controlled trial of tryptophan combined with fluoxetine to treat major depressive disorder: antidepressant and hypnotic effects / R.D. Levitan, J.H. Shen, R. Jindal // *J. Psychiatry Neurosci.* – 2000. – Vol.25, № 4. – P.337–346.
267. Lindsley, J.G. Selectivity in response to L-tryptophan among insomniac subjects: a preliminary report / J.G. Lindsley, E.L. Hartmann, W. Mitchell // *Sleep.* – 1983. – Vol.6, № 3. – P.247–256.

268. Linnoila, M. Efficacy and side effects of chloral hydrate and tryptophan as sleeping aids in psychogeriatric patients / M. Linnoila, M. Viukari, A. Numminen // *Int. Pharmacopsychiatry*. – 1980. – Vol.15, № 2. – P.124–128.
269. Liu, Y. Downregulation of caveolin-1 contributes to the synaptic plasticity deficit in the hippocampus of aged rats / Y. Liu, Z. Liang, J. Liu, et al. // *Neural Regen Res*. – 2013. – Vol.29, № 8. – P.2725–2733
270. Lucassen, P.J. Neuropathology of stress / P.J. Lucassen, J. Pruessner, N. Sousa, et al. // *Acta Neuropathol*. – 2014. – Vol.127. – P.109–135.
271. Lupien, S.J. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition / S.J. Lupien, F. Maheu, M. Tu, et al. // *Brain and Cognition*. – 2007. – Vol.65. – P.209–237.
272. Macarthur, H. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock / H. Macarthur, T.C. Westfall, D.P. Riley et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. – Vol.97, № 17. – P.9753–9758.
273. Macejka, J. Formation of reactive oxygen metabolites and activity of antioxidant enzymes in human blood cells as a function of age / J. Macejka, L. Bergendi, V. Balaz // *Biologia*. – 1988. – Vol.43, № 8. – P.723–730.
274. Maneatis, T. Effect of age on plasma glucose and insulin responses to a test mixed meal / T. Maneatis, R. Condie, G. Reaven // *J. Am. Geriatr Soc*. – 1982. – Vol.30, № 3. – P.178–182.
275. Mangge, H. Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease / H. Mangge, K. Becker, D. Fuchs, et al. // *World J Cardiol*. – 2014. – Vol.6, № 6. – P.462–477.
276. McEwen, B.S. Central role of the brain in stress and adaptation: Links to socioeconomic status, health, and disease / Bruce S. McEwen, Peter J. Gianaros // *Ann N.Y. Acad. Sci*. – 2010. – Vol.1186. – P.190–222.
277. Mendels, J. Reduced central serotonergic activity in mania: implications for the relationship between depression and mania / J. Mendels A. Frazer // *Br. J. Psychiatry*. – 1975. – Vol.126. – P.241–248.
278. Moshtaghiea, M. Catecholamine contents of different region of adult rat brain are altered following short and long-term exposures to Pb+2 / M. Moshtaghiea, P. Malekpourib, M. Saeed-zadehc, et al. // *Iranian J. of Pharm. Res*. – 2013. – Vol.12, № 2. – P.461–468.
279. Neri, M. Correlation between cardiac oxidative stress and myocardial pathology

- due to acute and chronic norepinephrine administration in rats / M. Neri, D. Cerretani, A. Fiaschi, et al. // J. Cell. Mol. Med. – 2007. – Vol.11, № 1. – P.156–170.
280. Nostramo, R. Regulation of Angiotensin II Type 2 Receptor Gene Expression in the Adrenal Medulla by Acute and Repeated Immobilization Stress / R. Nostramo, A. Tillinger, J.M. Saavedra // J. Endocrinol. – 2012. – Vol.215, № 2. – P.291–301.
281. Nyuyki, K.D. Chronic Subordinate Colony Housing (CSC) as a Model of Chronic Psychosocial Stress in Male Rats / K.D. Nyuyki, D.I. Beiderbeck, M. Lukas // PLoS One. – 2012. – Vol.7, № 12. – e52371. – P.1–11.
282. Okamoto, H. Diurnal variations in human urinary excretion of nicotinamide catabolites: effects of stress on the metabolism of nicotinamide / H. Okamoto, A. Ishikawa, et al. // Am J Clin Nutr. – 2003. – Vol.77, № 2. – P.406–410.
283. Oxenkrug, G.F. Tryptophan kynurenine metabolism as a common mediator of genetic and environmental impacts in major depressive disorder: the serotonin hypothesis revisited 40 years later // G.F. Oxenkrug // Isr J Psychiatry Relat Sci. – 2010. – Vol.47, № 1. – P.56–63.
284. Pacak, K. Pheochromocytoma: a catecholamine and oxidative stress disorder / K. Pacak // Endocr. Regul. – 2011. – Vol.45, № 2. – P.65–90.
285. Papanikolaou, N.A. A systems approach identifies co-signaling molecules of early growth response 1 transcription factor in immobilization stress / N.A. Papanikolaou, A. Tillinger, X. Liu, et al. // BMC Syst. Biol. – 2014. – Vol.8, № 1. – P.100.
286. Patchev, V.K. Experimental models of stress / V.K. Patchev, A.V. Patchev // Dialogues Clin Neurosci. – 2006. – Vol.8, № 4. – P.417–432.
287. Peart, J.N. Opposing Effects of Age and Calorie Restriction on Molecular Determinants of Myocardial Ischemic Tolerance / J.N. Peart, L.S. Hoe, S. Pepe // Rejuvenation Res. – 2012. – Vol.15, № 1. – P.59–70.
288. Petropoulos, I. Rat peptide methionine sulfoxide reductase: cloning of the cDNA, and down-regulation of gene expression and enzyme activity during aging / I. Petropoulos, J. Mary, M. Perichon, et al. // Biochem J. – 2001. – Vol.355, № 3. – P.819–825.
289. Petruzzi, E. Serum Total Antioxidant Capacity in healthy centenarians / E. Petruzzi,

- P. Pinzani, C. Orlando, et al. // *Bioluminescence and Chemiluminescence*. – 1997. – Vol.12, № 1. – P.55.
290. Picciotto, M.R. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior / M.R. Picciotto, M.J. Higley, Y.S. Mineur // *Neuron*. – 2012. – Vol.76, № 1. – P.116–129.
291. Prokic, M.D. Prooxidative effects of aspartame on antioxidant defense status in erythrocytes of rats / M.D. Prokic, M.G. Paunovic, M.M. Matic // *J. Biosci.* – 2014. – Vol.39, № 5. – P.859–866.
292. Rathore, N. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues / N. Rathore, S. John, M. Kale, et al. // *Pharmacol Res.* – 1998. – Vol.38, № 4. – P.297–303.
293. Ream, M.A. High oxygen prevents fetal lethality due to lack of catecholamines / M.A. Ream, R. Chandra, M. Peavey, et al. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2008. – Vol.295, № 3. – P.942–953.
294. Reiter, R.J. Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants / R.J. Reiter, D.X. Tan, J. Cabrera et al. // *Adv Exp Med Biol.* – 1999. – Vol.467. – P.379–387.
295. Reiter, R.J. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin / R.J. Reiter, D.X. Tan, J. Cabrera, et al. // *Biol Signals Recept.* – 1999. – Vol.8, № 1. – P.56–63.
296. Rikans, L.E. Age and gender differences in hepatic ascorbic acid concentrations and NADPH – dehydroascorbic acid reductase activity / L.E. Rikans, T.R. Lopez, K.R. Hornbrook // *Mech. Ageing and Dev.* – 1996. – Vol.91, № 3. – P.165–169.
297. Ring, A.M. Adrenaline-activated structure of β 2-adrenoceptor stabilized by an engineered nanobody / A.M. Ring, A. Manglik, A.C. Kruse, et al. // *Nature*. – 2013. – Vol.502. – P.575–579.
298. Rollo, C. D. Accelerated aging of giant transgenic mice is associated with elevated free radical processes / C.D. Rollo, J. Carlson, M. Sawada, J. Can // *Zool.* – 1996. – Vol.74, № 4. – P.606–620.
299. Rong-Rong, He. A New Oxidative Stress Model, 2,2-Azobis(2-Amidinopropane) Dihydrochloride Induces Cardiovascular Damages in Chicken Embryo / Rong-Rong He, Yan Li, Xiao-Di Li, et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol.8, № 3. – e57732. – P.1–8.

300. Rudnicka, A.R. Diurnal, seasonal, and blood-processing patterns in levels of circulating fibrinogen, fibrin D-dimer, C-reactive protein, tissue plasminogen activator, and von Willebrand factor in a 45-year-old population / A.R. Rudnicka, A. Rumley, G.D. Lowe // *Circulation*. – 2007. – Vol.115, № 8. – P.996–1003.
301. Salemi, G. Blood lipids, homocysteine, stress factors, and vitamins in clinically stable multiple sclerosis patients / G Salemi, M Concetta Gueli, F Vitale. et al. // *Lipids in Health and Disease*. – 2010. – Vol.19, № 19. – P.13–17.
302. Salmon, A.B. Lack of methionine sulfoxide reductase A in mice increases sensitivity to oxidative stress but does not diminish life span / A.B. Salmon, V.I. Perez, A. Bokov, et al. // *FASEB J*. – 2009. – Vol.23, № 10. – P.3601–3608.
303. Samuels, A.I. Effects of acetylcholinesterase on erythropoiesis in polycythemic and mildly plethoric mice / A.I. Samuels, L. Moller, J.W. Fisher // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1968. – Vol.149, № 1. – P.406–408.
304. Schlage, W.K. A computable cellular stress network model for non-diseased pulmonary and cardiovascular tissue / W.K. Schlage, J.W. Westra, S. Gebel, et al. // *BMC Syst Biol*. – 2011. – Vol.5. – P.168–181.
305. Schneider-Helmert, D. Evaluation of L-tryptophan for treatment of insomnia: a review / D. Schneider-Helmert, C.L. Spinweber // *Psychopharmacology (Berl)*. – 1986. – Vol.89, № 1. – P.1–7.
306. Semsel, I. Changes in the expression of superoxide dismutase and catalase as a function of age and dietary restriction / I. Semsel, G. Rao, A. Richardson // *Biochem. and Biophys. Res. Commun*. – 1989. – Vol.164, № 2. – P.620–633.
307. Shibasaki, M. Acetylcholine released from cholinergic nerves contributes to cutaneous vasodilation during heat stress / M. Shibasaki, T.E. Wilson, J. Cui, et al. // *Journal of applied physiology*. – 2002. – Vol.93, № 6. – P.1947–1951.
308. Shibata, K. Pharmacological doses of nicotinic acid and nicotinamide are independently metabolized in rats / K. Shibata, T. Fukuwatari, C. Suzuki // *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. – 2014. – Vol.60, № 2. – P.86–93.
309. Shimizu, T. Structure effect on antioxidant activity of catecholamines toward singlet oxygen and other reactive oxygen species in vitro / T. Shimizu, Y. Nakanishi, M. Nakahara, et al. // *J. clin. biochem. nutr*. – 2010. – Vol.47, № 3. – P.181–190.
310. Sine, S.M. End-plate acetylcholine receptor: structure, mechanism,

- pharmacology, and disease / S.M. Sine // *Physiol. Rev.* – 2012. – Vol.92, № 3. – P.1189–1234.
311. Skok, M.V. Functional Nicotinic Acetylcholine Receptors Are Expressed in B Lymphocyte-Derived Cell Lines / M.V. Skok, E.N. Kalashnik, L.N. Koval, et al. // *Molecular pharmacology.* – 2003. – Vol. 64, № 4. – P. 885–889.
 312. Sletvold, O Circadian rhythms of peripheral blood leukocytes in aging mice / O. Sletvold // *Mech. Ageing Dev.* – 1987. – Vol.39, № 3. – P.251–261.
 313. Sohal, R.S. Superoxide anion radical production in different animal species / R.S. Sohal, I. Svenson, B.H. Sohal et al. // *Mech. Ageing and Dev.* – 1989. – Vol.49, №2. – P.129–135.
 314. Soreq, H. Antisense oligonucleotide inhibition of acetylcholinesterase gene expression induces progenitor cell expansion and suppresses hematopoietic apoptosis ex vivo / H. Soreq, D. Patinkin, E. Lev-Lehman, et al. // *Proc. natl. acad. sci. U S A.* – 1994. – Vol.91, № 17. – P.7907–7911.
 315. Sternberg, E.M. The stress response and the regulation of inflammatory disease / E.M. Sternberg, G.P. Chrousos, R.L. Wilder, et al. // *Ann. Intern Med.* – 1992. – Vol.117, № 10. – P.854–866.
 316. Swaab, D.F. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration / D.F. Swaab, A.M. Bao, P.J. Lucassen // *Ageing. Res. Rev.* – 2005. – Vol.4, № 2. – P.141–94
 317. Takahashi, K. Comparison of the nicotinamide catabolism among rat strains / K. Takahashi, A. Okuno, T. Fukuwatari, et al. // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2009. – Vol.73, № 2. – P.274–279.
 318. Tatar, M. Induced sputum eosinophils, bronchial reactivity, and cough sensitivity in subjects with allergic rhinitis / M. Tatar, J. Petriskova, J. Zucha, et al. // *J. of physiology and pharm.* – 2005. – Vol.56. – P.227–236.
 319. Tian, X. Protective effect of l-theanine on chronic restraint stress-induced cognitive impairments in mice / X. Tian, L. Sun, L. Gou, et al. // *Brain Res.* – 2013. – Vol.153. – P.24–32.
 320. Urking, R. Rewiew of genetic investigations into the aging processes of *Drosophila* / R. Urking, S.P. Dudas // *J. Amer. Geriart. Soc.* – 1989. – Vol.37, № 8. – P.757–763.
 321. Velling, D.A. Sustained-release niacin for prevention of migraine headache /

- D.A. Velling, D.W. Dodick, J.J. Muir // Mayo Clin Proc. – 2003. – Vol.78, № 6. – P.770–781.
322. Venkataraman, K. Oxidative Stress in Aging-Matters of the Heart and Mind / K. Venkataraman, S. Khurana, T.C. Tai // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol.14, № 9. – P.17897–17925.
323. Vogel, C. Protein Expression Regulation under Oxidative Stress / Christine Voge Gustavo Monteiro Silva and Edward M. Marcotte // Mol. Cell Proteomics. – 2011. – Vol.10, №12. – P.111–117.
324. Walker, F.R. Stress as necessary component of realistic recovery in animal models of experimental stroke / F.R. Walker, K.A. Jones, M.J. Patience, et al. // J Cereb. Blood Flow. Metab. – 2014. – Vol.34, № 2. – P.208–214.
325. Wen, X. Immune responses in mice to arecoline mediated by lymphocyte muscarinic acetylcholine receptor / X. Wen, Y. Zhang, X. Liu, et al. // Cell biology international. – 2006. – Vol.30. – P.1048–1053.
326. Wood, G.E. Chronic immobilization stress alters aspects of emotionality and associative learning in the rat / G.E. Wood, E.H. Norris, E. Waters, et al. // Behav Neurosci. – 2008. – Vol.122, № 2. – P.282–292.
327. Woodhouse, P.R. Seasonal variation of serum lipids in an elderly population / P.R. Woodhouse, K.T. Khaw, M. Plummer // Age Ageing. – 1993. – № 4. – P.273–278.
328. Wu, M. Acetylcholinesterase inhibitors activate septohippocampal GABAergic neurons via muscarinic but not nicotinic receptors / M. Wu, S.S. Newton, J.B. Atkins // J. Pharm. Experim. Therapeut. – 2003. – Vol.307, № 2. – P. 535–543.
329. Yagi, K. Lipid peroxide level in the senescence-accelerated mouse / K. Yagi, K. Yoshino, S. Komura, et al. // J. Clin. Biochem. and Nutr. – 1988. – Vol.5, № 5. – P.21–27.
330. Zarazaga, L.A. Amplitude of the plasma melatonin nycthemeral rhythms is not associated with the dates of onset and offset of the seasonal ovulatory activity in the Ile-de-France ew / L.A. Zarazaga, B. Malpaux, P. Chemineau // Reprod Nutr. Dev. – 2003. – Vol.43, № 2. – P.167–177.
331. Zimniak, P. Relationship of electrophilic stress to aging / P. Zimniak // Free Radic Biol. Med. – 2011. – Vol.51, № 6. – P.1087–1105.