Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»

На правах рукописи

ОМАРОВА ЛЕЙЛА ТАДЖИБОВНА

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КРОВИ КРЫС ПРИ УМЕРЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ И ВВЕДЕНИИ ДАЛАРГИНА

03.01.04 - биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2013

Работа выполнена на кафедре химии Дагестанского государственного технического университета и кафедре биохимии и биофизики Дагестанского государственного университета.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор **Кличханов Нисред Кадирович**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор **Чиков Владимир Иванович** (ФГБУН «Казанский институт биохимии и биофизики» Каз НЦ РАН, зав. лабораторией)
кандидат биололгических наук, **Ганеева Лилия Ахатовна** (лаборатория биохимии нуклеиновых кислот института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет, научный сотрудник.)

Ведущая организация: **Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Казанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ**

Защита диссертации состоится 31 октября 2013 г. в 13^{00} часов на заседании диссертационного совета Д212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, Казанский (Приволжский) федеральный университет, аудитория № 211.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан «__ ___ _»____ _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор Абрамова З.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Процессы метаболизма кислорода в организме связаны с образованием активных форм кислорода (АФК), обладающих выраженной реакционной способностью. АФК образуются в результате нормально протекающих процессов в организме и выполняют определенную биологическую функцию. Действие АФК в организме фактически направлено на 3 типа клеточных мишеней: белки, нуклеиновые кислоты и липиды. В норме они активно участвуют в их метаболизме, а при патологических состояниях – в их окислительной деструкции (Меньщикова и др., Окислительный стресс: Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма «Слово». 2006. 554 с.; Magder. Critical Care. 2006. V. 10, N. 1. P. 208-216.).

В настоящее время общую и локальную гипотермию используют в медицинской практике, главным образом, в целях снижения кислородных запросов тканей и устранения ишемических и гипоксических явлений (Polderman, Crit. care Med. 2009. V. 37(7). P. S186-S202.). В то же время для ненаркотизированных животных гипотермия представляет определенную опасность, связанную с активацией свободнорадикальных процессов (СРП) в тканях (Дорохина, Зинчук, Весці НАН РБ. Сер. біял. нав. 2000. № 4. С. 87–90; Кличханов и др. Бюл. эксперим. биол. и мед. 2001. Т.131, № 3. С. 281-284.; Erecinska et al., J. Cereb. Blood Flow Metab. 2003. V. 23. P.513-550; Ахалая и др., Бюл. эксперим. биол. и мед. 2006. Т. 141, № 1. С. 31-34.). Свободнорадикальный гомеостаз клеток и тканей обеспечивается согласованием между ферментативными и неферментативными системами генерации АФК с одной стороны, и системами их элиминации – с другой. Гипотермия может смещать баланс в сторону избыточной генерации свободных радикалов и приводить к дефициту антиоксидантов (Zinchuk et al. J. Thermal Biology. 2002. V. 27. P. 345-352), что, в свою очередь, окажет существенное влияние на химический состав биологических мембран, их ультраструктурную организацию, проницаемость, активность мембранных ферментов. В связи с этим вопрос о возможности регуляторного влияния на СРП в тканях при гипотермических состояниях остается актуальным.

Антистрессорные вещества понижают интенсивность СРП и оказывают протекторное действие на мембраны. К таким веществам относится ряд пептидов, в частности синтетический гексапептид даларгин. Даларгин (Тир-Д-Ала-Гли-Фен-Лей-Арг) – синтетический аналог нейропептида лей-энкефалина, содержащий ключевую последовательность аминокислот всех опиоидов (Тир-Гли-Гли-Фен) (Лишманов, Маслов. Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1994. 352 с.). Показано, что предварительное внутрибрюшинное введение даларгина снижает степень активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) в миокарде крыс при ишемии и стрессовых воздействиях, а также в печени при холестазе (Лишманов и др. Успехи физиол. наук. 1997. Т. 28, № 1. С. 75-96;

Реброва и др. Биомедицинская химия .2005. Т. 51. С. 177-184). Внутривенно введенный даларгин (100 мкг/кг) предотвращал стимулируемую оксидантами (Fe^{2+}-аскорбат) активацию процессов ПОЛ в изолированном сердце (Лишманов и др. Бюлл. эксперим. биол. и мед. 1992. Т. 64, № 11. С. 468-470). Использование даларгина в комплексе общей анестезии ограничивало активацию ПОЛ в крови в реперфузионном периоде после аортокоронарного шунтирования (Князькова и др. Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2007. № 4. С. 21-26.). Предварительное введение даларгина (100 мкг/кг) предотвращало активацию ПОЛ в крови и нарушение структурно-функциональных свойств эритроцитов при гипотермии (Эмирбеков и др., Изв. вузов Сев.-Кав. рег. Естеств. науки. Спецвыпуск. 2005. С. 63-66.). Таким образом, при стрессорных и патологических состояниях введение даларгина предотвращает активацию СРП в тканях. Однако механизмы антиоксидантного действия даларгина пока еще полностью не установлены.

Цель исследования – изучить пути активации свободнорадикальных процессов в крови крыс при острой кратковременной умеренной гипотермии, а также механизмы их коррекции даларгином.

Задачи исследования:

1. Определить уровень гормонов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и тиреоидной систем в крови в условиях раздельного и сочетанного применения гипотермии и даларгина.

2. Провести сравнительный анализ интенсивности процессов ПОЛ в различных тканях до и после введения даларгина.

3. Изучить изменение уровня мочевой кислоты и метаболитов оксида азота в плазме крови при гипотермии на фоне введения даларгина.

4. Выявить действие даларгина на интенсивность окислительной модификации липидов и белков плазмы крови и мембран эритроцитов при умеренной гипотермии.

5. Оценить уровень прооксидантов и активность компонентов антиоксидантной защиты плазмы крови и эритроцитов при гипотермии и введении даларгина.

6. Показать степень перекисного, кислотного и внутрисосудистого гемолиза эритроцитов при гипотермии до и после введения даларгина.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Умеренная гипотермия сопровождается развитием холодового стресса, что приводит к стимуляции процессов образование АФК, окислительной модификации липидов и белков плазмы крови и мембран эритроцитов. Окислительные повреждения мембран эритроцитов при гипотермии приводят к их гемолизу.

2. Введение животным перед охлаждением даларгина предупреждает развитие холодового стресса, снижает стимулирующее действие гипотермии на интенсивность свободнорадикальных процессов в крови, защищает эритроциты от окислительного повреждения.

Научная новизна. Показано, что умеренная гипотермия приводит к гиперстимуляции гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы. Впервые установлено, что умеренная гипотермия стимулирует образование активных форм кислорода, повышение уровня прооксидантов в плазме, снижение содержания восстановленного глутатиона (GSH) в эритроцитах, что способствует развитию окислительного стресса в крови. Окислительные повреждения белков и липидов мембран эритроцитов при гипотермии приводят к ускорению внутрисосудистого гемолиза эритроцитов.

Установлено, что даларгин снижает интенсивность ПОЛ в различных тканях и этот эффект зависит от времени внутрибрюшинного введения пептида. Впервые установлено, что при низких концентрациях (100 мкг/кг.) даларгин не проявляет непосредственное антиоксидантное действие. Впервые показано, что введение даларгина предотвращает развитие холодового стресса у крыс при умеренной гипотермии. Даларгин в условиях гипотермии предотвращает рост уровня АФК в крови, степень окислительной модификации липидов и белков плазмы крови и мембран эритроцитов, падение уровня GSH в эритроцитах. Впервые показано, что даларгин предотвращает повышение уровня прооксидантов в крови при гипотермии. Защита мембран от окислительного повреждения даларгином предотвращает внутрисосудистый гемолиз эритроцитов при гипотермии.

Теоретическая и практическая значимость. Обнаруженные в работе закономерности развития свободнорадикальных процессов при умеренной гипотермии могут быть использованы для построения моделей взаимосвязи между интенсивностью энергетического обмена и генерацией свободных радикалов, а также для построения теории эволюции адаптивных механизмов, контролирующих СРП в клетках. Решение указанных теоретических проблем позволит разработать меры по предотвращению вспышек СРП при существенных изменениях интенсивности метаболических процессов в организме.

Результаты исследования расширяют представления о клеточных механизмах регуляции лигандами опиоидных рецепторов СРП. Полученные в данной работе факты, раскрывающие механизмы реализации антистрессорного, «антиоксидантного» и мембранностабилизирующего свойств даларгина (выпускаемого рядом фармацевтических фирм в качестве лекарственного препарата) в условиях гипотермии, открывают новые перспективы его практического применения в медицине с целью управления адаптационными реакциями организма.

Внедрение результатов работы в практику. Основные результаты работы внедрены в учебный процесс в виде методических разработок для проведения практических и семинарских занятий на кафедре биохимии и биофизики Дагестанского государственного университета и включены в спецкурс «Свободнорадикальные процессы в биологических системах».

Апробация работы. Результаты настоящего исследования были представлены и обсуждены на II Международной конференции «Актуальные

проблемы биологии, нанотехнологии и медицины» (г. Ростов-на-Дону, 2008), XXIX и XXX итоговых научно-технических конференциях преподавателей, сотрудников, аспирантов и студентов ДГТУ (Махачкала, 2008, 2009), 12-й, 14-й Международных школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, 2008, 2010), Всероссийской конференции «Закономерности распространения, воспроизведения и адаптаций растений и животных» (г. Махачкала, 2010), XXI съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2010), на расширенном заседании кафедры технологии приготовления пищи ДГТУ и кафедры биохимии и биофизики ДГУ (2012). По теме диссертации опубликовано 11 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы (239 источника). Диссертационная работа содержит 3 рисунка и 17 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на 226 крысах-самцах линии Вистар, массой 200-220 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Эксперимент проводился в соответствии с требованиями нормативных правовых актов, регламентирующих выполнение исследований по безопасности и эффективности фармакологических веществ в Р Ф (Приказ МЗ РФ «Об утверждении правил лабораторной практики» № 267 от 19.06.2003 г.) и международных правил правовых и этических норм использования животных.

Гипотермию вызывали наружным охлаждением животных в плексигласовых камерах. Температуру тела равномерно снижали от 38 до 30 ° С за 28-30 мин.

Фармакопейный препарат даларгин (НПО «Микроген») вводили однократно внутрибрюшинно в дозе 100 мкг/кг. массы тела за 30 мин. до декапитации (контроль) или за 30 мин.до начала снижения температуры тела крыс. Контрольным животным вводили соответствующий объем физиологического раствора. Дозы и сроки инъекции даларгина подобраны, основываясь на биохимических и физиологических эффектах пептида (Лишманов, Маслов, Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1994. 352 с.).

Из головного мозга, печени, миокарда и скелетных мышц готовили 10% гомогенаты в 0,1 М трис-HCl буфере рН 7,4. Гомогенаты тканей центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин. Постядерные гомогенаты использовали в опыты. Тени эритроцитов получали после гипоосмотического гемолиза (Казенов и др., Биохимия. 1984. Т. 49, № 7. С. 1089-1095.).

Исследование содержания адренокортикотропного гормона (АКТГ),

кортизола, тироксина в плазме крови проводилось радиоиммунологическим методом с использованием стандартных тест-наборов фирмы «Immunothech» (США) на гамма-счетчике «Микро-800» (США).

Интенсивность образования АФК оценивали по содержанию мочевой кислоты и оксида азота в плазме крови. Содержание мочевой кислоты в плазме крови определяли энзиматическим методом «Ольвекс Диагностикум». Уровень продукции оксида азота оценивали по содержанию его стабильных конечных метаболитов – нитратов и нитритов в плазме крови. Предварительно нитраты восстанавливали металлическим кадмием до нитритов, концентрации которых определяли по цветной реакции с реактивом Грисса (Емченко и др. Клин. лаб. диагностика. 1994. №6. С.19-20.).

Об интенсивности ПОЛ в крови судили по содержанию первичных (диеновых конъюгатов, ДК) и вторичных (малоновый диальдегид, МДА) продуктов пероксидации липидов. Содержание ДК в гептановых и изопропанольных экстрактах крови определяли по поглощению в ультрафиолетовой области спектра (Волчегорский и др. Вопр. мед. хим. 1994 . № 2. С. 28-32.). Количественное определение МДА в плазме крови и эритроцитах проводили по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Интенсивность ПОЛ в гомогенатах тканей оценивали по содержанию МДА (Лемешко и др. Укр. биохим. журн. – 1987. Т. 59. С. 50-57.). При этом измерено исходное содержание МДА и его накопление в гомогенатах тканей за 30 минут в присутствии системы Fe^{2+}-аскорбат.

Об интенсивности окислительной модификации белков (ОМБ) плазмы крови и мембран эритроцитов судили по содержанию в них карбонильных групп, реагирующих с 2,4-динитрофенолгидразином (Дубинина и др., Жизнь и смерть, созидание и разрушение. С.-Петербург, 2006. 400 с.). Содержание тиоловых групп в белках плазмы крови и мембран эритроцитов определяли методом амперометрического титрования (Соколовский.Лаб. дело. 1962. № 8. С. 3-6.), а дисульфидных связей – методом обратного титрования (Соколовский и др. Лаб. дело. 1977. № 1. С. 26-28.). Содержание среднемолекулярных пептидов (СМП) в плазме крови определяли по методу В.С. Осиповича и З.А. Тупиковой (1987). Общее содержание железа в сыворотке крови крыс определяли на биохимическом анализаторе «Ультра 906» фирмы «Коне» (Финляндия), с использованием тест-набора фирмы «Коне».

Содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах определяли методом Эллмана (Арутюнян и др. Методические рекомендации. СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. 104 с.). Об антиокислительной активности гидрофильных компонентов плазмы крови судили по кинетике окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом (Семёнов, Ярош. Укр. биохим. журн. 1985. Т. 57, № 3. С. 50-52.). Активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы определяли в гемолизатах. Об активности СОД судили по ее способности ингибировать процесс восстановления тетразолиевого нитросинего и феназинметасульфата в условиях генерации супероксидного анион-

радикала (Дубинина и др. Укр. биохим. журн. 1988. Т. 60, № 3. С. 20-24.). Об активности каталазы судили по скорости убыли перекиси водорода в среде инкубации (Королюк и др. Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16-19.). Содержание гемоглобина определяли аммиачным методом (Лопатина и др. Лаб. дело. 1976. № 6. С. 328-331.). Содержание белка в плазме крови определяли биуретовым методом (Скоупс.Методы очистки белков. – М.: Мир, 1985. 358 с.), а в мембранах эритроцитов – методом Лоури (Lowry et al..J. Biol. Chem. 1951. V. 193(1). P. 265-275.).

Перекисную резистентность эритроцитов определяли по методу Ю.А. Юркова (1984). Определение кислотной резистентности эритроцитов проводили с использованием 0,004 н. HCl в качестве гемолитика (Леонова. Анализ эритроцитарных популяций в онтогенезе человека. – Новосибирск: Наука, 1987. 242 с.). Интенсивность внутрисосудистого гемолиза оценивали по содержанию свободного гемоглобина в плазме крови (Турбина и др. Лаб. дело. 1970. № 2. С. 259-265.).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакетов прикладных программ Statistica-6.0 (Windows XP) и Microsoft Excel с использованием методов одномерной статистики. На гистограммах и в таблицах результаты представлены в виде средних значений (M) ± стандартная ошибка (m). Достоверность различий средних величин оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при значениях $p<0,05$. Между анализируемыми показателями также устанавливалась корреляционная взаимосвязь с использованием многофакторного регрессионного анализа (Юнкеров, Григорьев, Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. СПб.: ВМедА, 2002. 266 с.).

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние даларгина на содержание стрессорных гормонов в плазме крови при гипотермии

Результаты исследования содержания гормонов в плазме крови приведены в табл. 1. Умеренная гипотермия достоверно увеличивает содержание АКТГ в плазме крови на 22,9% относительно контроля. Полученные нами данные свидетельствуют о стимулирующем влиянии АКТГ на функции надпочечников в условиях низкой температуры тела, поскольку содержание кортизола в сыворотке крови повышается на 68,6%. Стимуляция секреции АКТГ и соответственно кортизола, обеспечивает адаптацию организма к стрессорному воздействию холода на организм.

При острой гипотермии содержание тироксина в сыворотке крови, в отличие от АКТГ и кортизола, снижается на 33,5% (табл. 1). Такое снижение содержания тироксина в сыворотке крови могло быть связано либо со сни-

жением его секреции из щитовидной железы, либо с усиленным поступлением гормона в ткани.

Таблица 1

Содержание адренокортикотропного гормона, кортизола и тироксина в сыворотке крови крыс при умеренной гипотермии и введении даларгина (M±m; n=8)

№	Группа животных	АКТГ, пг/мл	Кортизол, нМ/л	Тироксин, МЕ/л
1	Контроль	42,51±3,01	102,1±10,6	11,15±1,05
2	Даларгин + контроль	23,25±1,10 P_{1-2}<0,01	40,2±4,3 P_{1-2}<0,001	10,41±1,58
3	Гипотермия	52,25±4,42 P_{1-3}<0,01	172,1±7,7 P_{1-3}<0,02	7,42±1,20 P_{1-3}<0,02
4	Даларгин + гипотермия	27,31±2,62 P_{1-4}<0,001 P_{3-4}<0,001	148,3±7,0 P_{1-4}<0,05 P_{2-4}<0,02	10,87±0,53 P_{3-4}<0,01

Введение даларгина контрольным крысам приводит к значительному (на 45,3%) снижению содержания АКТГ в сыворотке крови (табл. 1). При гипотермии на фоне даларгина содержание АКТГ в сыворотке крови на 35,8% ниже, чем в контроле. Эти данные свидетельствуют о том, что опиоидный пептид существенно ослабляет стресс-индуцированную гиперстимуляцию кортикотропной функции гипофиза. Под действием даларгина у контрольных животных параллельно снижению содержания АКТГ, в плазме крови на 60,6% снижается содержание кортизола, что свидетельствует об ингибирующем влиянии даларгина на секрецию глюкокортикоида из надпочечников. Эти результаты согласуются с данными литературы об увеличении концентрации кортизола в плазме крови при введении блокатора опиоидных рецепторов налоксона (Coiro et al., Regulatory Peptides. – 2011. – Vol. 166. – P. 1-2.). При гипотермии на фоне даларгина содержание кортизола в сыворотке крови, в отличие от АКТГ, снижается в меньшей степени.

Введение даларгина контрольным крысам не влияет на содержание тироксина в сыворотке крови. При гипотермии даларгин полностью предотвращает падение уровня тироксина, обнаруженное при гипотермии без введения пептида.

Полученные результаты свидетельствуют об антистрессорном действии даларгина, направленном на профилактику истощения эндокринного статуса организма в условиях умеренной гипотермии.

Влияние даларгина на интенсивность процессов перекисного окисления липидов тканей в норме

Инкубирование гомогенатов тканей in vitro в течение 30 мин. в аэрируемых условиях приводит к росту содержания МДА в мозге, печени, миокарде, скелетных мышцах в 12.2, 9.8, 2.2, 2.4 раза соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Влияние даларгина (100 мкг/кг) на содержание МДА (нмоль/г) в гомогенатах тканей и плазме крови (мкмоль/л) крыс (M±m; n = 8-10)

Исследованная ткань	Контроль	Время введения даларгина	
		за 30 мин	за 120 мин
Мозг:			
исходный уровень МДА	31,3 ±1,94	18,8 ± 1,56*	25,0 ± 2,41
прирост МДА за 30 мин	382,1 ± 5,2	310,3 ± 12,0*	264,7 ± 14,9*
Печень			
исходный уровень МДА	24,0 ± 1,72	17,2 ± 2,1	18,0 ± 1,24
прирост МДА за 30 мин	235,1 ± 2,3	116,5 ± 8,6*	128,1 ± 11,3*
Миокард			
исходный уровень МДА	28,4 ± 1,12	6,8 ± 0,58*	18,5 ±1,24*
прирост МДА за 30 мин	52,2 ± 2,4	38,4 ± 1,8*	24,3 ± 3,3*
Мышцы			
исходный уровень МДА	26,1 ± 2,10	1,2 ± 0,21*	11,6 ± 1,06*
прирост МДА за 30 мин	61,4 ± 3,1	40,7 ± 3,0*	23,3 ± 3,0*
Плазма крови, мкмоль/л	1,99 ± 0,07	1,47 ± 0,08*	-

* – достоверные различия ($p<0,05$) относительно контроля

Более высокая интенсивность процессов ПОЛ в мозге по сравнению с другими тканями связана с физиологическими и биохимическими особенностями нервной ткани (Halliwell, J. Neurochem. – 2006.– V. 97. – P. 1634-1658).

Внутрибрюшинное введение даларгина за 30 минут перед декапитацией заметно подавляет процессы пероксидации липидов в тканях. Исходный уровень МДА при этом в мозге снижается на 39,5%, печени – на 28,3%, миокарде – на 76,1%, скелетных мышцах – на 95,4%, плазме крови – на 26,1% относительно контроля. Прирост МДА в инкубируемых гомогенатах исследованных тканей при этом также уменьшается. Как видно, под влиянием даларгина процессы ПОЛ снижается в большей мере в мышечных тканях. Различия в действии даларгина в исследованных тканях, по-видимому, связаны с неодинаковым поступлением даларгина в ткани (в связи разной скоростью кровотока, прохождением через гематоэнцефалический барьер и др.), а также с различиями в плотности опиоидных рецепторов в них.

При введении даларгина интактным животным за 2 часа до декапитации его ингибирующий эффект на процессы ПОЛ был также выражен, хотя и в меньшей степени, чем при более короткой экспозиции (табл. 2). Ослабление ингибирующего эффекта даларгина на процессы ПОЛ через 2 ч. после введения пептида возможно связано с его деградацией.

Для суждения о том, может ли даларгин оказывать прямое влияние на процессы ПОЛ или его действие опосредовано через гормональную, нервную, кровеносную системы, было исследовано влияние пептида на содержание продуктов липопероксидации в тканях in vitro.

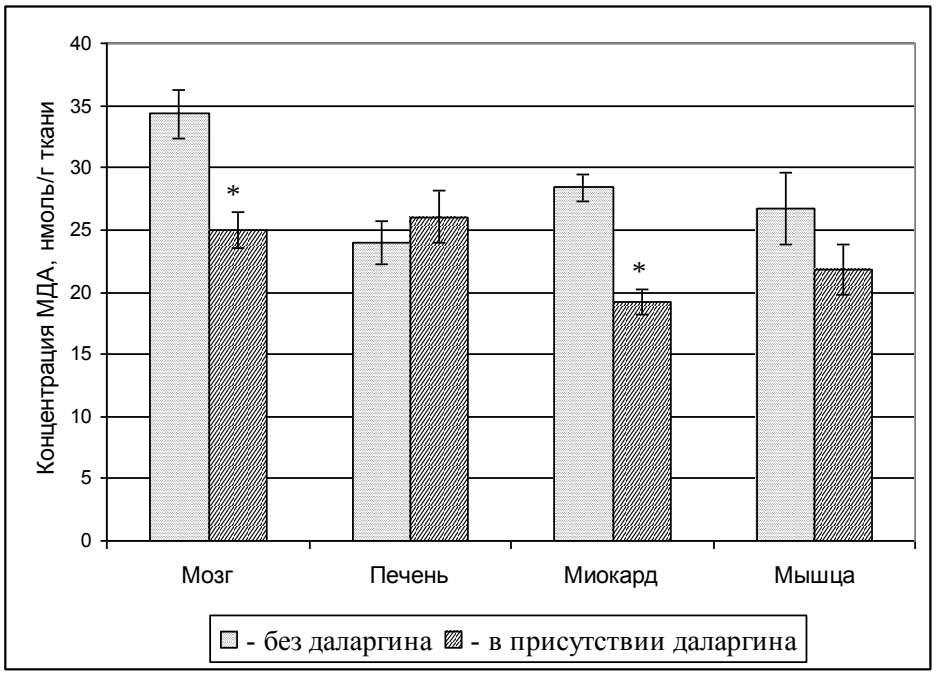

Рис. 1. Влияние даларгина на содержание малонового диальдегида в тканях крыс в условиях in vitro. Даларгин вводили в среду гомогенизации тканей (0,1 М трис-HCl буфер pH 7,4) из расчета 10 мкг на 100 мл среды и инкубировал в этой же среде. * – $p < 0,05$.

Оказалось, что при добавлении даларгина непосредственно к трис-HCl буферу, в котором проводили гомогенизацию и последующую инкубацию тканей, интенсивность образования МДА существенно понижается (рис. 1). Эти результаты свидетельствуют о том, что даларгин может оказать не только опосредованное, но и прямое воздействие на процессы ПОЛ.

Влияние гипотермии и даларгина на интенсивность генерации активных форм кислорода

Об интенсивности генерации АФК при гипотермии мы судили по содержанию мочевой кислоты и стабильных метаболитов NO в плазме крови. Полученные нами результаты позволили установить, что при гипотермии

существенно ускоряется образование АФК. Об этом свидетельствует повышение уровня мочевой кислоты в плазме крови на 66,2% (табл. 3). Это означает, что при гипотермии активируется ксантиноксидаза эндотелиальных клеток печени, которая наряду с мочевой кислотой образует супероксид анион (Berry, Hare, J. Physiol. – 2004. – V. 555(3). – P. 589-606.).

Инъекция даларгина контрольным животным приводит к незначительному повышению (7,3%) содержания мочевой кислоты в плазме крови (табл. 3). При гипотермии на фоне даларгина в плазме крови мочевая кислота накапливается меньше, чем при гипотермии без введения пептида. Уменьшение образования мочевой кислоты под действием даларгина, по-видимому, является результатом ингибирования пептидом ксантиноксидазы (Короткина и др., Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1990. – Т. 59, № 2. – С. 145-146.), что приводит к уменьшению образования $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2.

Таблица 3

Содержание мочевой кислоты и метаболитов оксида азота в плазме крови крыс при умеренной гипотермии и введении даларгина (M±m; n=8)

№	Группа животных	Содержание мочевой кислоты в плазме, мкмоль/л	Содержание метаболитов оксида азота в плазме, мкмоль/л
1	Контроль	242,8±15,1	23,5 ± 1,7
2	Даларгин + контроль	254,6±20,4	32,7 ± 1,9 P_{1-2} <0,01
3	Гипотермия	403,6±20,8 P_{1-3}<0,01	40,0 ± 2,5 P_{1-3} <0,001
4	Даларгин + гипотермия	325,6±29,0 P_{1-4}<0,01 P_{3-4}<0,01	31,2 ± 0,2 P_{1-4} <0,01

В активации СРП в крови принимают участие NO-радикалы. NO синтезируется как эндотелиальными, так и фагоцитирующими клетками. В наших исследованиях уровень оксида азота определялся по содержанию конечных продуктов обмена NO – нитратов и нитритов. Поэтому полученные данные представляют суммарный ответ всех видов NO-синтаз.

Анализ метаболитов оксида азота показал (табл. 3), что при умеренной гипотермии их содержание в плазме крови возрастает на 70,2% относительно контроля, что свидетельствует об активации процессов образования оксида азота. Эндотелиальный NO – основной вазодилататор (Rogers et al., Cardiovascular Research. – 2007. – 15. – P. 434- 441.). Однако при избыточной генерации супероксид может способствовать вазоконстрикции за счет связывания NO. Взаимодействие $O_2^{\cdot-}$ с оксидом азота приводит к образованию реакционного пероксинитрита ($ONOO^-$), который является сильным окислителем,

способным окислять NH- и SH-группы белков, индуцировать ПОЛ в мембранах и окислительную модификацию липопротеинов низкой плотности, а также снижать антиокислительную активность плазмы крови.

Введение даларгина контрольным крысам приводит к повышению уровня стабильных метаболитов оксида на 39,1% (табл. 3). Эти результаты согласуются с данными об активации даларгином опиоидных рецепторов в эндотелии артерий, что ведет к увеличению синтеза оксида азота (Маслов и др., Клинич. фармакол. и терапия. – 2004. – №4. – С. 47-52.). Однако в наших исследованиях при гипотермии не наблюдалось значительного увеличения содержания нитрит- и нитрат-ионов после стимуляции опиатных рецепторов, а, наоборот, происходило снижение уровня (на 22%) этих анионов в крови относительно гипотермии без введения пептида. Снижение уровня стабильных метаболитов оксида азота при введении даларгина у крыс с температурой тела 30°С возможно связано с активацией цикла оксида азота.

Таким образом, при умеренной гипотермии в плазме крови увеличивается содержание мочевой кислоты и метаболитов оксида азота, что свидетельствует об активации процессов образования АФК. Предварительное введение даларгина снижает интенсивность генерации АФК при гипотермии.

Влияние гипотермии и введения даларгина на интенсивность процессов перекисного окисления липидов крови

Основными молекулярными продуктами свободно-радикального окисления липидов являются ДК и МДА. В крови крыс при гипотермии содержание ДК в нейтральных липидах крови существенно не изменяется, а в полярных липидах их содержание достоверно возрастает на 20%. Гипотермия повышает в плазме крови и эритроцитах также содержание вторичного продукта ПОЛ – МДА (табл. 4). При этом рост уровня МДА в плазме крови составил 24,4%, а эритроцитах – на 29,3% относительно контроля.

У контрольных нормотермических животных даларгин достоверно не изменяет содержание ДК в липидах крови. Однако при гипотермии даларгин полностью устраняет повышение уровня первичных продуктов ПОЛ в крови.

Существенно влияет даларгин на содержание МДА в плазме крови (табл. 4). У контрольных животных даларгин через 30 мин после введения на 26% снижает содержание МДА в плазме крови. Введение даларгина до снижения температуры тела (30°С) приводит к падению уровня МДА в плазме крови как относительно контроля (на 38,2%), так и относительно гипотермии 30°С без введения пептида (на 50%). Даларгин препятствует повышению уровня МДА и в эритроцитах при гипотермии (табл. 4).

Таблица 4

Содержание малонового диальдегида в плазме крови и эритроцитах крыс при умеренной гипотермии и введении даларгина (M±m; n=8)

№	Группа животных	МДА в плазме, мкмоль/л	МДА в эритроцитах, мкмоль/л
1	Контроль	1,92 ± 0,06	52,3±2,4
2	Даларгин + контроль	1,46 ± 0,07 P<0,01	56,7±1,3
3	Гипотермия	2,39 ± 0,16 P_{1-3}<0,05	67,6±0,8 P_{1-3}<0,001
4	Даларгин + гипотермия	1,24 ± 0,06 P_{1-4}<0,001 P_{3-4}<0,001	56,2±0,6 P_{3-4}<0,01

Таким образом, при умеренной гипотермии образующиеся АФК способствуют окислительной деструкции липидов плазмы крови и мембран эритроцитов.

Интенсивность окислительной модификации белков плазмы крови и мембран эритроцитов при гипотермии и введении даларгина

Карбонильные группы являются одним из ранних и надежных маркеров окислительной модификации белков (Dalle-Done et al., Clinica Chimica Acta. – 2003 – V. 329. – P. 23-38.). При определении ОМБ нами использовались два показателя: исходный уровень карбонильных групп и карбонильные группы, индуцированные реактивом Фентона (Fe^{2+}+ЭДТА+H_2O_2). Если первый показатель характеризует конститутивную активность окислительной модификации белков, то второй, характеризующий приращение ОМБ после стимуляции реактивом Фентона, указывает на количество субстрата для ОМБ и возможность его вовлечения в эти процессы.

Исследование содержания карбонильных групп у контрольных животных свидетельствует о протекании радикал-индуцируемого окисления плазменных белков в физиологических условиях (табл. 5). Индукция ОМБ плазмы крови существенно увеличивает содержание карбонильных групп в белках.

Умеренная гипотермия на 162% увеличивает исходный уровень карбонильных групп в белках плазмы крови (табл. 5). Однако при этом достоверно не изменяется скорость окисления белков в условиях *in vitro*.

Как видно из табл. 5, введение даларгина контрольным животным не оказало влияния на исходное содержание карбонильных групп в белках, однако, незначительно, но достоверно снизило их накопление в модельной сис-

теме. При умеренной гипотермии даларгин незначительно, но достоверно снижает содержание карбонильных групп в белках. Эти результаты свидетельствуют о том, что даларгин способствует повышению устойчивости белков плазмы крови крыс к оксидантам при понижении температуры тела.

Таблица 5

Влияние гипотермии и даларгина на содержание карбонильных групп (нмоль/мг белка) в белках плазмы крови крыс (M±m; n=6-8)

№	Группа животных	Исходный уровень карбонильных групп	Прирост карбонильных групп за 15 мин при Fe^{2+}-зависимом окислении
1	Контроль	1,50±0,06	57,24±1,48
2	Даларгин + контроль	1,44±0,12	52,63±1,28 $P_{1-2}<0,05$
3	Гипотермия	3,91±0,10 $P_{1-3}<0,001$	58,82±1,42
4	Даларгин + гипотермия	3,07±0,19 $P_{1-4}<0,001$ $P_{3-4}<0,01$	53,56±1,67 $P_{3-4}<0,05$

Исследование интенсивности ОМБ мембран эритроцитов контрольных животных выявило в них сопоставимое с белками плазмы крови количество карбонильных групп (табл. 6). Индукция ОМБ мембран эритроцитов существенно увеличивает в них количество карбонильных групп, но значительно меньше, чем в белках плазмы крови. Это означает, что в составе мембран белки менее доступны оксидантам.

При умеренной гипотермии исходный уровень карбонильных групп в белках мембран эритроцитов увеличивается на 140% (табл. 6). При этом на 17,5% возрастает и скорость окисления белков в условиях *in vitro*. Однонаправленность процессов спонтанной и индуцированной ОМБ свидетельствует об окислительной деструкции мембранных белков эритроцитов при гипотермии. Обнаружена корреляция между уровнем МДА в плазме и уровнем карбонильных групп в белках плазмы (1,00, $p<0,05$), а также уровнем МДА в эритроцитах и уровнем карбонильных групп в белках мембран эритроцитов (0.96, $p<0,05$) при гипотермии. Это означает, что при умеренной гипотермии в крови развивается окислительный стресс, способствующий окислительной деструкции липидов и белков как плазмы, так и эритроцитов.

Таблица 6

Влияние гипотермии и даларгина на содержание карбонильных групп (нмоль/мг белка) в белках мембран эритроцитов крыс (M±m; n=6-8)

№	Группа животных	Исходный уровень карбонильных групп	Прирост карбонильных групп за 15 мин при Fe^{2+}-зависимом окислении
1	Контроль	$1,84 \pm 0,09$	$11,32 \pm 0,23$
2	Даларгин + контроль	$1,91 \pm 0,10$	$11,82 \pm 1,06$
3	Гипотермия	$4,42 \pm 0,41$ $P_{1,3}<0,001$	$13,30 \pm 0,75$ $P_{1,3}<0,05$
4	Даларгин + гипотермия	$2,64 \pm 0,15$ $P_{1,2}<0,05$ $P_{3,4}<0,05$	$12,61 \pm 1,02$

Введение даларгина контрольным животным не влияет как на спонтанную, так и индуцированную ОМБ мембран эритроцитов (табл. 6), а при гипотермии защищает мембранные белки от окислительной деструкции.

Металл-катализируемое окисление белков – это сайт специфический процесс, в который вовлекаются H_2O_2 и Fe^{2+} (Stadtman, Free Radic. Biol. Med. – 1990. – V. 9. – P. 315-325.). В связи с важной ролью ионов железа в индукции ОМБ было исследовано его содержание в плазме крови. По нашим данным содержание железа в сыворотке крови составляет $19,0 \pm 2,5$ мкмоль/л. При умеренной гипотермии уровень железа в сыворотке крови возрастает на 30% ($24,7 \pm 1,2$ мкмоль/л) относительно контроля. Наличие положительной корреляции ($r = 0.81$) межу уровнем железа в плазме крови и интенсивностью ОМБ свидетельствует об участии этих ионов в окислительной деструкции белков плазмы и мембран эритроцитов при гипотермии.

Введение даларгина контрольным крысам на 36,2% ($12,0 \pm 1,1$ мкмоль/л) снижает содержание железа в плазме крови. При гипотермии даларгин полностью предотвращает повышение уровня железа ($20,2 \pm 0,9$ мкмоль/л) в плазме крови. Эти результаты свидетельствуют о том, что снижение интенсивности свободнорадикального окисления липидов и белков крови при гипотермии на фоне даларгина в определенной мере связано с предотвращением роста уровня железа и, возможно, его свободной формы под действием даларгина.

В условиях окислительного стресса SH-группы белков могут подвергаться окислению с образованием соответствующих дисульфидов. Повышение соотношения S-S/SH, обозначаемое как окислительный индекс, считается одним из показателей окислительной (главным образом под действием свободных радикалов) модификации мембранных белков (Soszynski, Bartosz,

Free Radic. Biol. Med. – 1997. – V. 23, N. 3. – P 463-469.). Как показали наши исследования, при умеренной гипотермии в белках плазмы крови существенно (на 74%) увеличивается содержание дисульфидных связей. Это является еще одним свидетельством того, что окислительный стресс, развивающийся в условиях умеренной гипотермии, способствует окислительной модификации белков крови. Важную роль в их окислительной деструкции при этом могут играть H_2O_2 и $ONOO^-$, поскольку они способны окислять SH-группы белков (Halliwell, Gutteridge, Clarendon Press, 1999. – 936.p.). Выяснилось, что даларгин при умеренной гипотермии препятствует накоплению дисульфидных связей в белках плазмы крови.

Анализ тиоловой редокс-системы белков мембран эритроцитов показал, что в них при умеренной гипотермии на 19% снижается общее количество SH-групп (табл. 7). В то же время заметно (на 33%) увеличивается количество дисульфидных связей в мембранных белках. В целом, эти изменения на 64% увеличивают окислительный индекс мембранных белков, что свидетельствует о стимулирующем влиянии умеренной гипотермии на процессы ОМБ мембран эритроцитов. Известно, что окисление тиоловых групп мембранных белков приводит к повышению проницаемости мембраны для ионов, а также снижает деформируемость эритроцитов (Wang et al., Clin. Hemorheol. Microcirc. – 1999. – V. 21. – P. 137-146.).

Введение даларгина препятствует окислению тиоловых групп белков мембран эритроцитов (табл. 7).

Установлено, что окисленные белки, в отличие от нативных, значительно быстрее подвергаются протеолизу под действием специфических протеаз (Davies, Biochimie. – 2001. – V. 83, N. 314. – P. 301-310.), в результате чего образуются низкомолекулярные олигопептиды. Свидетельством протеолиза белков является обнаружение кислоторастворимых среднемолекулярных пептидов (СМП) в крови и тканях.

Таблица 7

Содержание SH-групп и S-S-связей (нмоль/мг белка) и их соотношение в белках мембран эритроцитов крыс при гипотермии и введении даларгина (M ± m; n = 10)

№	Группа животных	SH-группы	S-S-связи	Окислительный индекс (S-S/SH)
1	Контроль	128,9±1,8	20,9±1,2	0,162
2	Даларгин + контроль	126,9±3,5	19,4±1,0	0,153
3	Гипотермия	104,5±2,7 $P_{1-3}<0,001$	27,8±1,3 $P_{1-3}<0,05$	0,266
4	Даларгин + гипотермия	125,6±2,9	21,8±1,7	0,177

Результаты анализа СМП показали (табл. 8), что их содержание в плазме крови и эритроцитах при гипотермии возрастает примерно на 40 %. Изменение содержания СМП в плазме крови и эритроцитах положительно коррелирует ($r = 0.96$, $p<0.05$) с изменением степени ОМБ плазмы крови и мембран эритроцитов при гипотермии. Установлено, что СМП увеличивают ионную проницаемость мембраны эритроцитов и ингибируют Na, К-АТФазу (Галактионов и др., Хим. фарм. журнал. – 1991. – Т. 25, № 11. – С. 8-10.). Кроме того, различные фракции СМП стимулируют процессы ПОЛ (Волчегорский и др., Вопр. мед. хим. – 1994. – № 2. – С. 28-32.). Эти факты позволяют предположить, что повышение содержания СМП в крови является дополнительным фактором патогенеза при гипотермии.

Таблица 8

Содержание среднемолекулярных пептидов в плазме крови крыс при гипотермии и введении даларгина (M±m; n=8)

№	Группа животных	Содержание СМП, г/л	
		плазма	эритроциты
1	Контроль	0,729±0,024	25,72 ± 1,38
2	Контроль + даларгин	0,632±0,015 $P_{1-2}<0,02$	26,50 ± 1,65
3	Гипотермия 30°С	1,021±0,070 $P_{1-3}<0,01$	36,54 ± 1,39 $P_{1-3}<0,01$
4	Гипотермия 30°С + даларгин	0,750±0,038 $P_{3-4}<0,01$	28,23 ± 2,37

Даларгин способствует снижению уровня СМП в крови (табл. 8). Так, через 30 мин после инъекции даларгина содержание СМП в плазме крови контрольных крыс достоверно снижается. При гипотермии 30°С даларгин полностью предотвращает рост содержания СМП как в плазме крови, так и в эритроцитах. Нормализация уровня СМП в крови даларгином при гипотермии, по-видимому, связана с предотвращением интенсификации ОМБ, что снижает атакуемость белков протеиназами.

Таким образом, анализ содержания карбонильных и тиоловых групп свидетельствует о стимуляции окислительной модификации белков плазмы крови и мембран эритроцитов и их последующий протеолиз при умеренной гипотермии, а введение даларгина защищает их от окислительной деструкции.

Влияние гипотермии и введения даларгина на активность компонентов антиоксидантной защиты крови

Результаты исследования различных звеньев антиоксидантной защиты представлены в табл. 9. При гипотермии антиокислительная активность (АОА) гидрофильных компонентов плазмы крови достоверно выше (на 25%), чем в контроле. Высокая АОА при гипотермии обеспечивается, по-видимому, за счет накопления в крови таких антиоксидантов, как аскорбиновая кислота, мочевая кислота, билирубин, белков типа трансферина и церулоплазмина, которые связывают металлы переменной валентности, препятствуя их вступлению в реакцию Габера-Вейса.

Таблица 9

Антиокислительная активность гидрофильных компонентов плазмы крови и содержание глутатиона в эритроцитах крыс при умеренной гипотермии и введении даларгина (M±m; n=8)

№	Группа животных	Антиокислительная Активность гидрофильных компонентов, %	Глутатион, ммоль/л
1	Контроль	59,2 ± 1,4	2,43±0,10
2	Даларгин + контроль	65,7 ± 1,0 P_{1-2}<0,01	4,38±0,16 P_{1-2}<0,001
3	Гипотермия	74,1 ± 0,6 P_{1-3}<0,001	2,01±0,05 P_{1-3}<0,05
4	Даларгин + гипотермия	63,5 ± 0,9	2,43±0,05 P_{2-4}<0,001

Эритроциты, как известно, играют роль системных акцепторов (уборщиков) свободных радикалов, помогающих справляться с оксидативным стрессом. Это связано с тем, что эритроциты содержат более чем 99% общего GSH крови. При гипотермии содержание GSH в эритроцитах снижается на 17,3% относительно контроля (табл. 9). В условиях окислительного стресса падение уровня GSH в эритроцитах способствует освобождению ионов железа из гемоглобина, которые стимулируют процессы ПОЛ и гемолиз эритроцитов (Comporti et al.,Free Rad. Biol. Med. – 2002. – Vol. 32(7). – P. 568-576.).

Анализ ферментативного звена антиоксидантной защиты показал, что при гипотермии активность СОД эритроцитов повышается на 23% (рис. 2). В отличие от СОД активность каталазы при гипотермии не изменяется. Повышение АОА плазмы и активности СОД эритроцитов при умеренной гипотермии, очевидно, имеет компенсаторный характер и направлено на снижение СРП в крови.

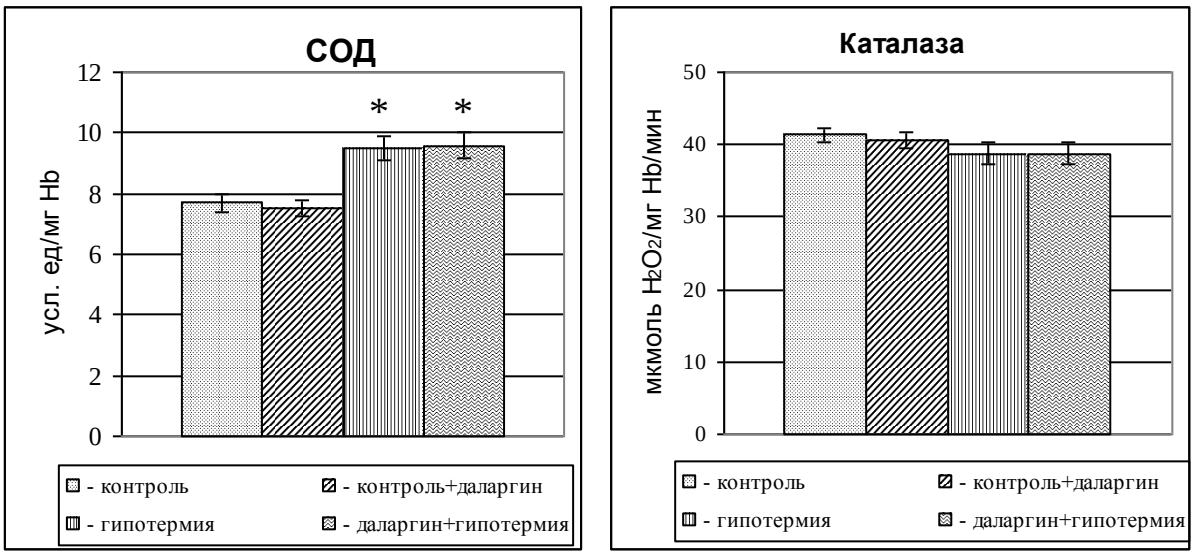

Рис. 2. Активность супероксиддисмутазы и каталазы эритроцитов крыс при умеренной гипотермии и введении даларгина.

Таким образом, совокупность полученных нами данных свидетельствует о том, что окислительный стресс, развивающийся при умеренной гипотермии в крови, способствует компенсаторному повышению активности гидрофильных АОА плазмы крови и СОД эритроцитов с одной стороны, и снижению уровня восстановленного глутатиона эритроцитов с другой.

Влияние даларгина на степень перекисного гемолиза эритроцитов при гипотермии

У контрольных животных гемолиз эритроцитов индуцированный H_2O_2 выше по сравнению с гемолизом, индуцированным Fe^{2+}+аскорбат (рис. 3).

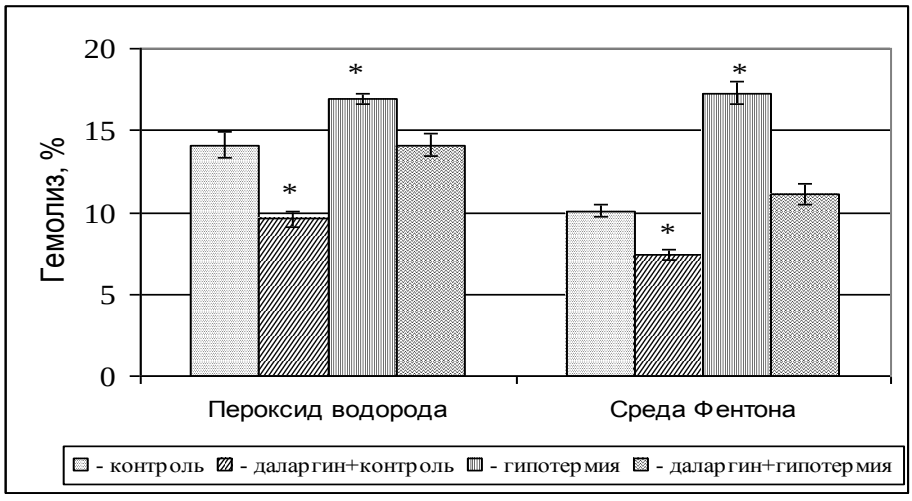

Рис. 3. Изменение степени перекисного гемолиза эритроцитов крыс при гипотермии и введении даларгина.

При умеренной гипотермии достоверно возрастает степень индуцированного как H_2O_2 (20%), так и Fe^{2+}+аскорбат (71%) гемолиза. Таким образом, при гипотермии наблюдается снижение перекисной резистентности эритро-

цитов. Устойчивость эритроцитов к окислительному гемолизу является показателем индуцибельности перекисного окисления мембранных фосфолипидов (Тюлина и др., Биохимия. – 2000. – Т. 65, вып. 2. – С. 218-224.). Исходя из этого, можно заключить, что гипотермия существенно изменяет липидную матрицу мембраны эритроцитов и ее обеспеченность антиоксидантами, в результате чего увеличивается доступность жирнокислотных остатков фосфолипидов к действию окислителей.

У контрольных животных даларгин повышает перекисную устойчивость эритроцитов (рис. 3). При гипотермии даларгин предотвращает снижение перекисной устойчивости эритроцитов, видимо сохраняя запасы антиоксидантов и структурной устойчивости мембраны при низких температурах тела.

Динамика кислотного и внутрисосудистого гемолиза эритроцитов крыс при гипотермии и введении даларгина

При умеренной гипотермии вдвое сокращается общая продолжительность гемолиза и достоверно снижается время 50%-го гемолиза эритроцитов (рис. 4).

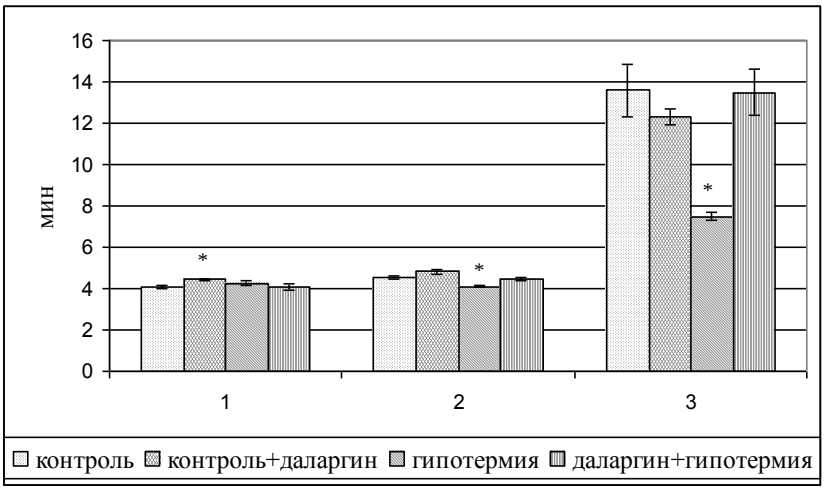

Рис. 4. Время выхода основного пика (1), время 50%-го гемолиза (2) и общая продолжительность гемолиза эритроцитов (3) крыс при гипотермии и введении даларгина

Скорость протекания гемолиза зависит от скорости проникновения протонов в цитозоль клеток, которая в свою очередь определяется ионной проницаемостью мембраны и усиливается при ее окислительном повреждении (Тюлина и др., Биохимия. – 2000. – Т. 65, вып. 2. – С. 218-224.). Следовательно, снижение кислотной устойчивости эритроцитов при гипотермии означает повышение ионной проницаемости их мембран в результате окислительного повреждения. С этим выводом согласуется и действие даларгина на гемолиз при гипотермии. В условиях гипотермии даларгин препятствует снижению кислотной резистентности эритроцитов (рис. 4) по сравнению с гипотермией, вызванной без введения данного пептида. Таким образом,

предварительное внутрибрюшинное введение даларгина предотвращает падение кислотостойкости эритроцитов в условиях гипотермии.

В качестве одного из тестов для оценки степени повреждения эритроцитов используют определение в плазме крови внеэритроцитарного гемоглобина. Выяснилось, что гипотермия способствует не только снижению резистентности эритроцитов к кислотному гемолитику, но и повышает интенсивность внутрисосудистого гемолиза этих клеток. Содержание свободного гемоглобина в плазме крови при умеренной гипотермии возрастает в 8 раз (рис. 5).

Снижение деформируемости эритроцитов в результате окислительной модификации мембранных белков и липидов способствует снижению пластичности клеток и может привести к задержке эритроцитов в микрососудистом русле и внутрикапиллярному гемолизу. Усилению гемолиза поврежденных эритроцитов при глубокой гипотермии способствуют существенное повышение сопротивления сосудов кровотоку, повышение вязкости крови, агрегация эритроцитов (Липина, Луговой, Биофизика. – 1996. – Т.41, вып. 3. – С. 678-679; Lee et al., Am. J. Phys. Regul. Integ. Comp. Physiol. – 2000. – V. 278. – P. 1040-1047.).

Предварительное введение даларгина существенно снижает интенсивность внутрисосудистого гемолиза эритроцитов при умеренной гипотермии.

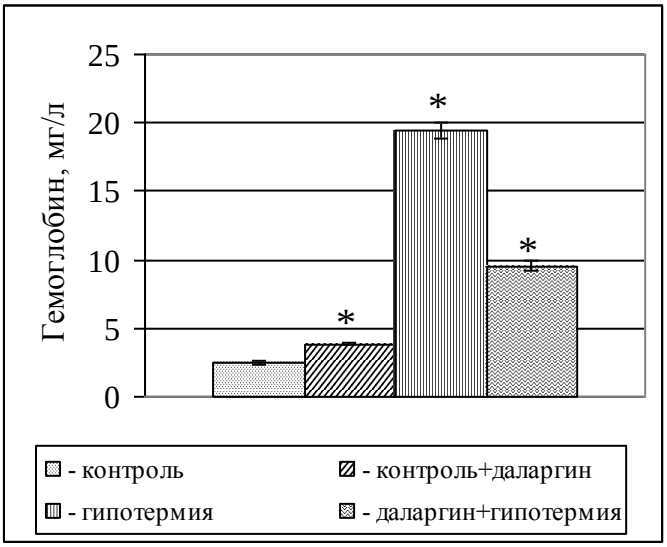

Рис. 5. Влияние гипотермии и введения даларгина на содержание свободного гемоглобина (мг/л) в плазме крови крыс.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что при умеренной гипотермии в процессах гемолиза эритроцитов важную роль играют окислительные повреждения мембран. С этими представлениями согласуются и эффекты даларгина при гипотермии. Даларгин эффективно снижает СРП в крови при умеренной гипотермии, что предотвращает и гемолиз эритроцитов.

ВЫВОДЫ

1. Гипотермический стресс способствует активации гипофизарно-надпочечниковой системы и ингибированию тиреоидной эндокринной системы. Даларгин при гипотермии существенно ослабляет стресс-индуцированную гиперстимуляцию гипофизарно-надпочечниковой системы, а также нормализует уровень тироксина в крови.

2. Внутрибрюшинное введение даларгина снижает интенсивность процессов перекисного окисления липидов в различных тканях и этот эффект зависит от времени введения пептида. Ингибирующее действие на процессы ПОЛ наблюдается и в условиях in vitro при введении пептида в среду гомогенизации тканей. В использованной нами дозе даларгин не обладает непосредственным антиоксидантным действием.

3. Умеренная гипотермия стимулирует образование активных форм кислорода и азота, о чем свидетельствует повышение уровня мочевой кислоты и метаболитов оксида азота в крови. Предварительное введение даларгина предотвращает существенный рост уровня свободных радикалов кислорода и азота в крови при гипотермии.

4. При умеренной гипотермии существенно активируются процессы окислительной модификации липидов и белков плазмы крови и мембран эритроцитов. Прооксидантное действие при этом могут оказать ионы железа, свободный гемоглобин и среднемолекулярные пептиды. Даларгин предотвращает окислительную деструкцию липидов и белков плазмы крови и мембран эритроцитов при гипотермии.

5. Активация свободнорадикальных процессов в крови при гипотермии приводит компенсаторному повышению антиокислительной активности плазмы крови и активности СОД эритроцитов и снижению содержания восстановленного глутатиона в эритроцитах. При гипотермии даларгин предотвращает изменение уровня антиоксидантов в плазме крови и эритроцитах, но не влияет на активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах.

6. Нарушение структуры мембраны при гипотермии приводит к существенному снижению устойчивости эритроцитов к гемолитикам, а также способствует их внутрисосудистому гемолизу. При гипотермии даларгин предотвращает снижение перекисной и кислотной устойчивости эритроцитов и их внутрисосудистый гемолиз, за счет сохранения запасов антиоксидантов и структурной устойчивости мембраны при низких температурах тела.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список работ, опубликованных в изданиях рекомендованных ВАК РФ

1. Таджибова Л.Т., Астаева М.Д., Исмаилова Ж.Г., Даудова Т.Н., Кличханов Н.К. Влияние даларгина на свободнорадикальные процессы в крови

крыс при умеренной гипотермии // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2010. – Т. 150, № 9. – С. 271-274.

2. Таджибова Л.Т., Даудова Т.Н., Кличханов Н.К. Влияние даларгина на интенсивность перекисного окисления липидов в тканях крыс // Вестник Дагестанского государственного технического университета. Технич. науки. – 2011. – Т. 20, № 1. – С.105-113.

3. Маяхи Мохаммед Т. Джабер, Таджибова Л.Т., Даудова Т.Н., Кличханов Н.К. Влияние даларгина на содержание стрессорных гормонов и липопротеинов в сыворотке крови крыс при гипотермии // Вестник Дагестанского государственного университета. Естественные науки. – 2012. – № 1. – С.

4. Кличханов Н.К., Таджибова Л.Т., Лукманова С., Даудова Т.Н. Влияние даларгина на содержание стрессорных гормонов в крови крыс при гипотерми // Закономерности распространения, воспроизведения и адаптаций растений и животных. Матер. Всерос. конф. Махачкала. – 2010 – С. 289-291.

5. Исмаилова Ж.Г., Таджибова Л.Т., Кличханов Н.К. Влияние даларгина на содержание среднемолекулярных пептидов в плазме крови при гипотермии // Материалы II Междунар. конф. «Актуальные проблемы биол., нанотехнол. и мед.» – Ростов-на-Дону, 2008. – С. 25-26.

6. Таджибова Л.Т., Кличханов Н.К., Даудова Т.Н. Влияние даларгина на интенсивность перекисного окисления липидов крови крыс при гипотермии // Сб. тез. докл. XXIX итог. науч.-техн. конф. преп., сотр., аспир. и студ. ДГТУ. Техн. науки. – Махачкала, 2008. – С. 185-186.

7. Таджибова Л.Т., Астаева М.Д., Даудова Т.Н., Кличханов Н.К. Влияние даларгина на свободнорадикальные процессы в крови при умеренной гипотермии // Сб. тез 12 Междунар. Пущинской школы-конф. молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2008. – С. 108.

8. Таджибова Л.Т Тиол-дисульфидное редокс-состояние белков мембран эритроцитов при гипотермии // Сб. тез. докл. XXX итоговой науч.-техн. конф. преподавателей, сотрудников, аспирантов и студентов ДГТУ. – Махачкала: Лотос, 2009. Ч. 1. – С. 186-187.

9. Таджибова Л.Т. Влияние даларгина на свободнорадикальные процессы в тканях // Сб. тез. докл. XXX итоговой науч.-техн. конф. преподавателей, сотрудников, аспирантов и студентов ДГТУ. – Махачкала: Лотос, 2009. Ч. 1. – С. 196-197.

10. Исмаилова Ж.Г., Астаева М.Д., Таджибова Л., Гюлиева Э.Ф., Кличханов Н.К. Влияние даларгина на свободнорадикальные процессы в крови крыс при гипотермии // «Биология – наука XXI века». Сб. тез. 14-ой Междун. Пущинской школы-конф. молод. ученых – Пущино, 2010. – С. 28-29.

11. Кличханов Н.К., Астаева М.Д., Исмаилова Ж.Г., Таджибова Л.Т. Коррекция даларгином свободнорадикальных процессов в крови крыс при гипотермии // XXI Съезд Физиологического общества им. И.П.Павлова. Тезисы докладов. – М.-Калуга: Типография ООО "БЭСТ-принт", 2010. – С. 275.

Принятые сокращения и условные обозначения

АКТГ – адренокортикотропный гормон
АОА – антиокислительная активность
АФК – активные формы кислорода
ДК – диеновые конъюгаты
МДА – малоновый диальдегид
ОМБ – окислительная модификация белков
ПОЛ – перекисное окисление липидов
СМП – среднемолекулярные пептиды
СОД – супероксиддисмутаза
СРП – свободнорадикальные процессы
GSH – восстановленный глутатион

420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание КФУ,
отдел аттестации научных кадров, ученому секретарю
диссертационного совета Д212.081.08 проф. Абрамовой З.И.,
факс: (843)238-76-01. e-mail: ziabramova@mail.ru

Подписано в печать 20.09.2013г.
Формат 60x84$_{1/16}$. Печать ризографная. Бумага офсетная.
Гарнитура «Таймс». Усл. п. л. 1,5. Тираж 100 экз.

Отпечатано в типографии АЛЕФ, ИП Овчинников М.А.
367000, РД, г.Махачкала, ул. С.Стальского 50
Тел.: +7-903-477-55-64, +7-988-2000-164
E-mail: alefgraf@mail.ru