

На правах рукописи

НИКИТИНА ЮЛИЯ ВИКТОРОВНА

**ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ
В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И КРОВИ КРЫС**

03.00.04 - биохимия

03.00.13 – физиология

Автореферат

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Нижний Новгород - 2009

Работа выполнена в Центральной научно-исследовательской лаборатории НИИ Прикладной и фундаментальной медицины ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации»

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Мухина Ирина Васильевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Конторщикова
Клавдия Николаевна

доктор медицинских наук,
профессор

Перетягин
Сергей Петрович

Ведущая организация:

Российский государственный
медицинский университет
г. Москва

Защита состоится « ____ » декабря 2009 г. в « ____ » часов на заседании Диссертационного совета Д 212.166.15 при ГОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23)

Автореферат разослан « ____ » ноября 2009 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Копылова
Светлана Вячеславовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Изучение закономерностей развития организма является главной теоретической задачей возрастной физиологии (Безруких М.М., 2008). На каждом из этапов онтогенеза организм имеет специфические особенности, никогда не встречающиеся в таком же сочетании на других этапах (Смирнов В.М., 2000; Анисимов В.Н., 2003; Карпенко М.П. и др., 2009; Угрюмов М.В., 2009). Особенно длителен период формирования функций головного мозга (Меркулова Н.А., 1974; Фарбер Д.А. и др., 1990). Основой функциональной активности ЦНС является изменение биохимических процессов в нервной ткани (Ашмарин И.П., 1996; Ашмарин И.П., 1999). Установление законов роста и развития организма от рождения до биологического созревания способствует пониманию процессов, приводящих впоследствии к его старению. Кроме того, изучение онтогенетических закономерностей необходимо для эффективного поиска решения проблемы возникающих возрастных нарушений метаболизма тканей (Дильман В.М., 1983; Войтенко В.П., 1986; Дильман В.М., 1986).

Центральное место в биохимических превращениях, лежащих в основе жизнедеятельности, занимают окислительные процессы, протекающие в клетках (Разумович, 1972; Журавлев А.И., 1982; Барабой В.А., 1992). Кислород, с одной стороны, является необходимым компонентом процессов генерации энергии, с другой стороны, осуществляет передачу сигналов из внешней и внутренней среды организма через регуляторные свободнорадикальные механизмы (Дубинина Е.Е., 2001; Сазонтова Т.Г., 2004; Сороко С.И., 2004; Дубинина Е.Е., 2006).

В литературе содержится обширная информация о состоянии окислительных процессов в тканях организма разного возраста (Аршавский А.И., 1988; Журавлев А.И., 1991; Клименко Л.Л., 1999; Тодоров И.Н., 2003; Волчегорский И.А., 2007; Bunker V.W., 1992; Mo J.Q. et.al., 1995; Dogru-Abbasoglu S. et.al., 1997; Tian L. et.al., 1998; Leutner S. et.al., 2001). Однако эти данные носят фрагментарный характер, касаются отдельных моментов окислительного обмена в различных тканях, несравнимых между собой данных по возрасту животных. Это затрудняет выявление возрастной динамики биохимических изменений, связанных с физиологическими преобразованиями, в онтогенезе. Имеющиеся литературные данные не позволяют составить индивидуальную характеристику окислительного статуса организма в зависимости от возраста.

Одной из проблем возрастной физиологии является выявление сенситивных и критических периодов развития. Возраст оказывает существенное влияние на уровень предельных возможностей функциональных систем организма (Безруких М.М., 2008). Для направленного решения вопросов применения воздействий прооксидантного и антиоксидантного характера на организм необходим молекулярный уровень исследования окислительных процессов, прежде всего при созревании, становлении функций головного мозга (Гуськова Т.А., 2003). Все сказанное позволяет считать, что оценка возрастных изменений окислительных процессов в головном мозге и крови является важной характеристикой состояния тканей организма и важным ориентиром при метаболической коррекции.

Цель и задачи исследования

Цель работы: Изучить изменения окислительных процессов в головном мозге и крови крыс в разные возрастные периоды.

Для достижения цели нами решались следующие задачи:

1. Изучить изменения окислительных процессов в ткани головного мозга и крови крыс периодов молочного кормления, полового созревания и репродуктивного периода.
2. Исследовать интенсивность свободнорадикальных процессов в ткани головного мозга и крови крыс и особенности функционального состояния ЦНС в зависимости от пола животных в препубертатный период полового созревания.
3. Выявить взаимосвязь между свободнорадикальными процессами в головном мозге и крови и поведенческими реакциями крыс препубертатного возраста периода полового созревания.

Научная новизна

В диссертации впервые проведено комплексное изучение изменений показателей свободнорадикального окисления и углеводного обмена в ткани головного мозга и крови крыс трех возрастных периодов: периода молочного кормления, полового созревания и репродуктивного периода. Выявлено снижение интенсивности окислительных процессов от периода молочного кормления к репродуктивному периоду. В период полового созревания показано увеличение свободнорадикальных процессов на фоне снижения антиоксидантной активности, повышение уровня лактата, карбонильных

производных белков, снижение устойчивости эритроцитов к перекисному окислению.

В препубертатном возрасте периода полового созревания установлена зависимость от половой принадлежности животных интенсивности свободнорадикальных процессов в ткани головного мозга и крови и поведенческих реакций крыс в тесте «открытое поле»: горизонтальной и вертикальной двигательной активности, груминга, реакции замиранья. Показана корреляционная связь свободнорадикальных процессов и поведенческих реакций крыс в препубертатном возрасте. Выявлена обратная корреляционная связь между ориентировочно-исследовательской активностью крыс и уровнем молекулярных продуктов перекисного окисления липидов, между эмоциональностью крыс и активностью антиоксидантной системы, между горизонтальной двигательной активностью и интенсивностью свободнорадикальных процессов в крови крыс.

Научно-практическая значимость

Полученные данные позволяют расширить знания о характере и степени становления окислительных процессов в клетках головного мозга и крови, их роли в постнатальном развитии организма.

Они могут быть использованы при экспериментальном моделировании в биологии и медицине, при чтении лекций по биохимии и физиологии человека и животных, при разработке теории старения, при направленном решении вопросов применения воздействий прооксидантного и антиоксидантного характера на организм.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Окислительные процессы в ткани головного мозга и крови крыс характеризуются снижением интенсивности свободнорадикальных процессов и показателей углеводного обмена от периода молочного кормления (0,5 месяцев) к репродуктивному периоду (5-8 месяцев).

2. В период полового созревания (возраст 1-4 месяца) окислительные процессы в ткани головного мозга и крови крыс характеризуются увеличением продуктов перекисного окисления липидов на фоне снижения антиоксидантной активности, увеличением уровня карбонильных производных белков и накоплением лактата.

3. В препубертатном возрасте (2 – 3,5 месяца) интенсивность свободнорадикального окисления и поведенческие реакции зависят от половой принадлежности животных.

4. Между показателями свободнорадикальной активности и поведенческими реакциями крыс в препубертатном возрасте (2 – 3,5 месяца) имеются корреляционные зависимости.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на международной конференции «Свободнорадикальные процессы и антиоксиданты в развитии и функциях нервной системы: от плода к старению» (Санкт-Петербург, 2001), Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» - «Фундаментальная и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2007), на XX съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2007). Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ГОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития РФ и апробирована на расширенном заседании НИИ ПФМ НижГМА (Нижний Новгород, 2009).

Объём и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Объем работы составляет 156 страниц, включает 46 рисунков и 7 таблиц. Список литературы содержит 185 источников: 138 – отечественных и 47 - иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах были использованы 180 крысят, которые рождались в виварии НИИ ПФМ ГОУ ВПО НижГМА Минздравсоцразвития РФ. Возрастные группы экспериментальных животных представлены в таблице 1. Срок рождения животных строго фиксировался. Крысы содержались в стандартных условиях вивария и не подвергались никаким воздействиям. Все процедуры обращения с экспериментальными животными соответствовали Приказу Минздрава России № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации» и согласованы с правилами, установленными этическим комитетом при ГОУ ВПО НижГМА Минздравсоцразвития РФ.

Таблица 1

Возрастные группы экспериментальных животных

Периоды жизни крыс	Возраст		
Период молочного кормления:	Подсосный (средний молочный) 0,5 мес		
Период полового созревания:			
Неполовозрелый Инфантильный (поздний молочный) 1мес, 1,5 мес	Возраст предслучный (ювенильный)		
	Препубертатный I 2 мес, 2,5 мес	Препубертатный II 3 мес, 3,5 мес	Пубертатный 4 мес
Период репродуктивный:	Половозрелый: Молодой - 5 мес, 6 мес, 8 мес, 9 мес Зрелый - 12 мес		

Таблица 2

Методы исследования

Состояние свободнорадикального окисления	<ol style="list-style-type: none"> 1. Индуцированная хемилюминесценция (I_{\max}, $S=1/AOA$, $\text{tg } \alpha$) (Кузьмина Е.И. и др., 1983); 2. Молекулярные продукты ПОЛ: диеновые конъюгаты (ДК), триеновые конъюгаты (ТК), двойные связи (ДС) (Fletcher D.L. et.al., 1973), малоновый диальдегид (МДА) (Smith, J.B., 1976; Орехович, 1977); 3. Уровень карбонильных производных белков в плазме крови (Дубинина Е.Е., 1995); 4. Супероксиддисмутаза (Nishirimi M, 1972); 5. Каталаза (Aebi H, 1970)
Состояние углеводного обмена	Метод определения количества лактата и пирувата в крови и тканях животных (Асатиани В.С., 1965, Кочетов П.А., 1980)
Метод оценки поведенческих реакций	Тест «открытое поле» (Буреш Я. и др., 1991)
Метод оценки мнестических функций ЦНС	Метод выработки УРПИ (Буреш Я. и др., 1991)

Методы исследования поведенческой активности, мнестических функций ЦНС и окислительных процессов в ткани головного мозга и крови крыс представлены в таблице 2.

Полученные данные были обработаны с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 6.0. Статистическую оценку достоверности межгрупповых отличий проводили по критериям непараметрической статистики, используя:

- Критерий межгруппового сравнения Краскела - Уоллиса ANOVA;
- Критерий Манна - Уитни для двух независимых выборок;
- Критерий Вилкоксона для двух зависимых выборок;
- Корреляционный анализ по методу Спирмена.

Выборки считались принадлежащими к разным генеральным совокупностям при $p < 0,05$ (Гланц С., 1998; Реброва О.Ю., 2002).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Возрастные изменения окислительных процессов в ткани головного мозга крыс

В период молочного кормления (группа «0,5 месяцев») выявлены максимальные значения показателей: оАОА - $(0,26 \pm 0,06)$ отн.ед., активности СОД - $(7,09 \pm 1,63)$ ед.акт./г тк*мин, каталазы - $(0,63 \pm 0,08)$ ед.акт./г тк*сек, ДК - $(0,33 \pm 0,13)$ ед.опт.пл./ОЛ, ДС - $(0,37 \pm 0,12)$ ед.опт.пл./ОЛ, пирувата - $(0,48 \pm 0,26)$ мкмоль/г тк, лактата - $(0,66 \pm 0,35)$ мкмоль/ г тк по сравнению с периодом полового созревания и репродуктивным периодом (табл. 3).

В период полового созревания выявлено снижение значений показателей окислительных процессов в ткани головного мозга крыс (табл. 3). В инфантильном возрасте (группа «1,5 месяца») оАОА на 54% меньше ($p=0,034$), активность каталазы на 84,12% меньше ($p=0,034$), чем у крыс в возрасте 0,5 месяцев; в «2 месяца» количество пирувата на 60,52% меньше ($p=0,046$), лактата на 19,15% меньше ($p=0,046$) по сравнению с возрастом 1 месяц.

В ткани головного мозга крыс в препубертатный возраст II (3,5 месяца) по сравнению с препубертатным возрастом I (2 месяца) (табл. 4) у **самцов** выявлено снижение уровня МДА на 11,3% ($p=0,009$), повышение активности СОД на 21,7% ($p=0,037$), повышение активности каталазы на 1% ($p=0,028$); у **самок** снижение количества ТК на 66,7% ($p=0,02$), ДС на 14,8% ($p=0,025$), МДА на 25,73% ($p=0,019$), повышение активности каталазы на 1,9% ($p=0,014$).

Выявлено увеличение свободнорадикальных процессов на фоне снижения антиоксидантной активности и повышение количества лактата в середине препубертатного возраста (2,5 - 3,5 месяца) по сравнению с инфантильным

возрастом и периодом молочного кормления (табл. 3). В группе «3,5 месяца» оАОА на 46,15% меньше ($p=0,05$), активность каталазы на 73% меньше ($p=0,025$), I тах на 67,57% больше ($p=0,049$) по сравнению с группой «0,5 месяцев». В группе «2,5 месяца» количество лактата на 61,7% больше ($p=0,046$), в группе «3 месяца» пирувата на 57,89% меньше ($p=0,046$), в 2,5 месяца значение показателя лактат/пируват на 164,46% больше ($p=0,02$), в 3 месяца на 183,27% больше ($p=0,02$), в 3,5 месяца на 91,66% больше ($p=0,02$) по сравнению с группой «1 месяц» (рис. 1).

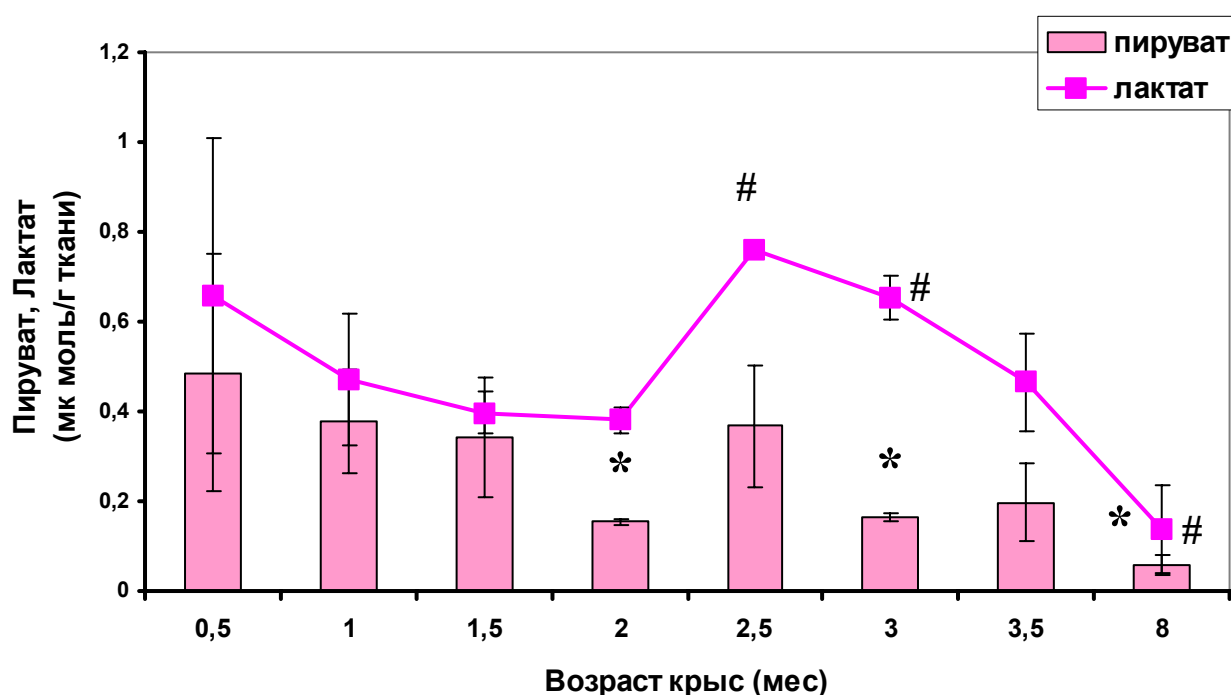


Рис. 1. Возрастные изменения количества пирувата и лактата в ткани головного мозга крыс, отличия статистически значимы по критерию Манна – Уитни при парном сравнении с группой «1 месяц»: * - пируват, # - лактат, ($p<0,05$).

В конце периода полового созревания, в пубертатный возраст (4 месяца) происходило снижение показателей ДК на 60,60% ($p=0,021$), ТК на 62,5% ($p=0,021$), оАОА на 34,61% ($p=0,034$), активности каталазы на 76,19% ($p=0,036$) и СОД на 57,83% ($p=0,025$) по сравнению с периодом молочного кормления (возраст 0,5 месяцев) (табл. 3).

Выявлено снижение свободнорадикальных процессов в *репродуктивный период* по сравнению с периодом полового созревания. В группе «5 месяцев» ДК на 44,68% меньше ($p=0,021$), ТК на 62,71% меньше ($p=0,025$), ДС на 56,86% меньше ($p=0,034$), оАОА на 14,59% ($p=0,021$) больше по сравнению с группой

«3 месяца» (рис. 2). В ткани головного мозга крыс в возрасте 8 месяцев наблюдали снижение активности СОД на 56,1% ($p=0,034$), пирувата на 87,5% ($p=0,02$), лактата на 78,8% ($p=0,02$) по сравнению с группой «0,5 месяцев». В «9 месяцев» выявлено снижение активности каталазы на 63,5% ($p=0,018$) по сравнению с группой «0,5 месяцев» (табл. 3).

В репродуктивном периоде от 5 месяцев к 12 месяцам в ткани головного мозга крыс выявлено повышение показателей свободнорадикальных процессов: ДК на 80,24% ($p=0,034$), ТК на 120,24% ($p=0,034$), ДС на 93,44% ($p=0,021$) (рис.2).

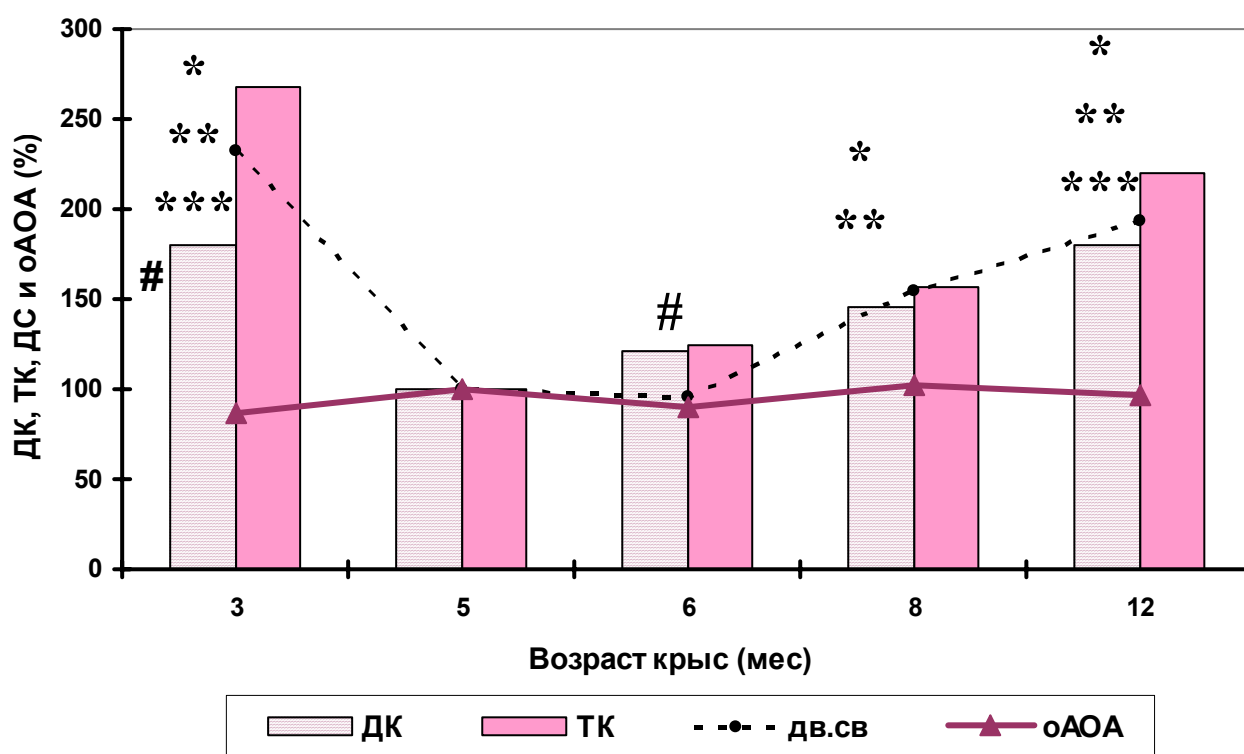


Рис. 2. Возрастная зависимость количества диеновых, триеновых конъюгатов, двойных связей и общей антиоксидантной активности в ткани головного мозга крыс: статистически значимые отличия при парном сравнении по критерию Манна – Уитни с группой возрастом 3 месяца * - ДК; ** - ТК; *** - ДС; # - оАОА, $p<0,05$.

Таким образом, в ткани головного мозга крыс выявлено снижение показателей окислительных процессов от периода молочного кормления (0,5 месяцев) к репродуктивному периоду (5 - 8 месяцев). В период полового созревания наблюдали повышение свободнорадикальных процессов на фоне снижения антиоксидантной активности, накопление лактата. При переходе от молодого (8 месяцев) к зрелому возрасту (12 месяцев) репродуктивного

периода установлено повышение значений свободнорадикальных процессов в ткани головного мозга крыс.

2. Возрастные изменения окислительных процессов в крови крыс

Количественные показатели крови характеризуют возрастные особенности обменных процессов в организме (Лопатина Н.И., 1988; Анисимов В.Н. и др., 1999).

В крови крыс *периода молочного кормления* («0,5 месяцев») (табл. 3) выявлены следующие значения показателей: оАОА - $(0,22 \pm 0,05)$ отн.ед., ДК - $(0,15 \pm 0,03)$ ед.опт.пл./ОЛ, ТК - $(0,08 \pm 0,01)$ ед.опт.пл./ОЛ, ДС - $(0,33 \pm 0,05)$ ед.опт.пл./ОЛ, активности СОД - $(173,3 \pm 16,7)$ ед.акт./г Нв*мин, активности каталазы - $(29,26 \pm 3,16)$ ед.акт./г Нв*сек, пирувата - $(0,06 \pm 0,03)$ мкмоль/мл, лактата - $(4,87 \pm 1,3)$ мкмоль/мл (рис. 3).

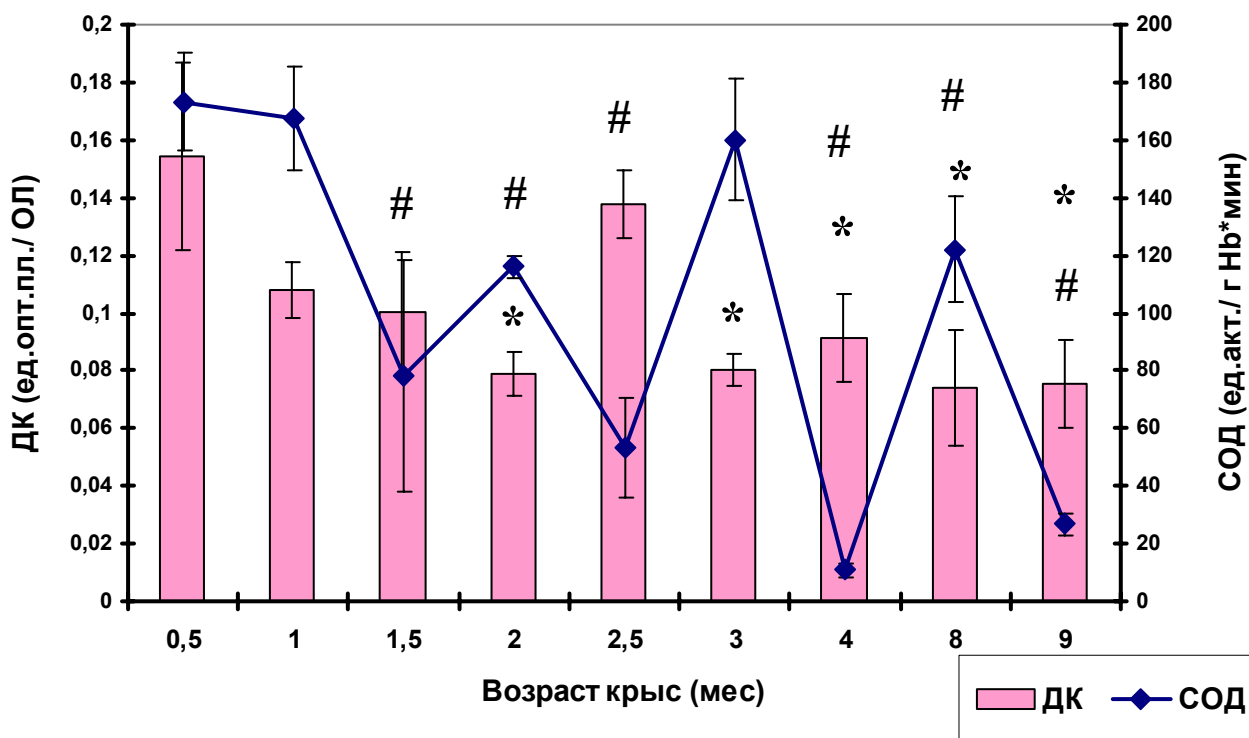


Рис. 3. Возрастные изменения количества диеновых конъюгатов в плазме крови и активности СОД в крови крыс. Статистически значимые отличия при парном сравнении значений по критерию Манна – Уитни с группой «0,5 месяцев»: * - ДК; # - СОД, ($p < 0,05$).

В *период полового созревания* (табл. 4) у **самцов** в возрасте 3,5 месяца выявлено снижение показателей I max на 15,25% ($p = 0,013$), ТК на 28,6% ($p = 0,004$), ДС на 40,54% ($p = 0,004$), каталазы на 11,82% ($p = 0,008$) по сравнению с самцами в возрасте 2 месяца.

Таблица 3

Возраст крысы (мес)	Показатели окислительных процессов в ткани головного мозга крыс (M±SD)									
	I max	oAOA	ДК	ТК	ДС	МДА	СОД	Каталаза	Лак/Пир	
0,5	0,37±0,06	0,26±0,06	0,33±0,13	0,08±0,03	0,37±0,12	-	7,09±1,63	0,63±0,08	1,50±0,61	
1	0,43±0,07	0,26±0,03	0,27±0,09	0,10±0,03	0,28±0,08	0,17±0,02	6,06±2,79	0,28±0,21*	1,35±0,59	
1,5	0,57±0,07*	0,12±0,01*	0,26±0,08	0,06±0,01	0,31±0,07	0,02±0,01	4,89±2,29	0,10±0,04*	1,29±0,45	
2	0,55±0,01	0,11±0,01	0,19±0,01	0,07±0,07	0,22±0,14	0,12±0,05	5,16±4,31	0,23±0,00	-	
2,5	0,36±0,02	0,29±0,05	0,30±0,14	0,10±0,04	0,47±0,32	-	4,5±0,31	0,52±0,05	3,58±0,46*	
3	0,40±0,02	0,22±0,01	0,21±0,03	0,11±0,07	0,33±0,11	0,22±0,09	4,47±3,36	0,31±0,08	3,83±0,04*	
3,5	0,62±0,03*	0,14±0,01	0,26±0,06	0,06±0,03	0,26±0,08	0,08±0,04	3,97±1,76	0,17±0,03*	2,59±0,32*	
4	0,63±0,05*	0,17±0,02*	0,13±0,01*	0,03±0,01*	0,18±0,06	0,25±0,18	2,99±1,12*	0,15±0,05*	-	
8	0,41±0,11	0,2±0,04	0,25±0,11	0,13±0,15	0,29±0,23	0,15±0,05	3,11±0,00*	-	1,57±0,30	
9	0,77±0,01*	0,14±0,01*	0,19±0,04	0,05±0,03	0,20±0,05	0,17±0,02	5,23±1,86	0,23±0,10*	-	
	Показатели окислительных процессов в крови крыс (M±SD)									
	I max	oAOA	ТК	ДС	МДА	Каталаза	tg (α) _{эп.}	Пируват	Лактат	Лак/Пир
0,5	0,48±0,17	0,22±0,05	0,08±0,01	0,33±0,05	-	29,26±3,16	0,16±0,10	0,06±0,03	4,87±1,30	74±7
1	0,66±0,12	0,11±0,03*	0,07±0,02	0,15±0,03*	-	35,36±0,35*	0,12±0,02	0,06±0,01	6,60±0,32	108±4
1,5	1,36±0,32*	0,08±0,01*	0,04±0,00*	0,17±0,02*	-	23,02±1,35*	0,04±0,02&	0,04±0,00#	6,68±0,91	173±12#
2	1,10±0,24*	0,09±0,02*	0,04±0,01*	0,13±0,02*	0,03±0,01	9,59±1,10	0,15±0,01	0,03±0,01#	4,16±0,34#	115±13
2,5	0,55±0,13	0,07±0,01*	0,04±0,00*	0,23±0,01*	0,02±0,00	21,94±5,23	0,09±0,02&	0,05±0,01	6,68±1,14	146±6#
3	0,76±0,13	0,08±0,02*	0,04±0,01*	0,18±0,07*	0,03±0,00	24,78±4,15	0,02±0,01&	0,03±0,01#	5,16±0,06#	157±11
3,5	0,55±0,11	0,12±0,02*	0,06±0,01*	0,16±0,02*	0,04±0,00	19,73±3,60*	0,12±0,01&	0,01±0,01#	4,49±0,31#	340±25#
4	1,41±0,33*	0,09±0,01*	0,07±0,01	0,42±0,10	0,05±0,00	16,03±0,91	0,10±0,01&	-	-	-
8	0,38±0,07	0,07±0,01*	0,03±0,00*	0,18±0,04*	0,08±0,01	16,51±3,00*	0,21±0,04	0,02±0,01#	6,36±0,98	-
9	0,73±0,07*	0,10±0,01*	0,04±0,01*	0,15±0,05*	0,05±0,01	23,40±1,26*	0,04±0,01	-	-	-

Примечание: * - с группой «0,5 месяцев»; # - с группой «1 месяц», & - с группой «8 месяцев», (p<0,05)

Таблица 4

Пол и Возраст крыс	Показатели окислительных процессов в ткани головного мозга крыс (M±SD)							
	I max	oAOA	ДК	ТК	ДС	МДА	СОД	Каталаза
Сц 2 мес	1,60±0,12	0,07±0,01	0,11±0,02	0,04±0,00	0,10±0,01	3,01±0,07	7,65±0,75	1,05±0,01
Ск 2 мес	1,44±0,14*	0,06±0,01*	0,16±0,06*	0,09±0,01*#	0,27±0,03*#	2,41±0,24*#	10,43±0,79*	1,05±0,01#
Сц 3,5 мес	1,63±0,12#	0,07±0,005	0,14±0,02*#	0,04±0,01	0,09±0,03	2,67±0,16*#	9,31±0,70*#	1,06±0,01*
Ск 3,5 мес	1,38±0,16	0,07±0,01	0,10±0,01	0,03±0,01	0,23±0,18	1,79±0,33	12,76±1,99	1,07±0,01
Показатели окислительных процессов в крови крыс (M±SD)								
	I max	oAOA	ДК	ТК	ДС	МДА	СОД	Каталаза
Сц 2	4,00±0,25	0,023±0,00	0,13±0,012	0,07±0,004	0,37±0,01#	2,43±0,19	1049±71	1,10±0,01
Ск 2	3,46±0,18*	0,029±0,00*#	0,14±0,003*	0,06±0,006*#	0,36±0,02	2,35±0,23#	1715±443*#	1,07±0,05
Сц 3,5	3,39±0,29*	0,03±0,001*#	0,11±0,005#	0,05±0,003*#	0,22±0,02*#	2,54±0,30#	1200±173	0,97±0,01*#
Ск 3,5	3,50±0,32	0,026±0,00	0,14±0,015	0,04±0,003	0,33±0,07	4,59±0,72	1185±160	1,08±0,02
Показатели поведенческих реакций крыс в тесте «открытое поле» (M±SD)								
	ГДА	ВДА	ПЦК	ВРЗ (сек)	Г			
Самцы 2 месяца	115,17±8,52	14,33±7,99	2,29±0,49	3,38±4,72	14,60±4,56			
Самки 2 месяца	106,86±23,46#	15,00±3,39#	2,57±0,53	6,83±7,76#	1,50±2,51*			
Самцы 3,5 месяца	96,33±18,85#	12,33±2,25#	2,38±0,52	3,86±4,88#	2,57±2,94*			
Самки 3,5 месяца	56,33±34,63	3,71±1,98	2,33±0,52	25,00±6,88	0,00±0,00			

Примечание: значимое отличие * - с группой «самцы 2 месяца», # - с группой «самки 3,5 месяца», (p<0,05).

В крови крыс пубертатного возраста (4 месяца) периода полового созревания (табл. 3, рис. 3) выявлено увеличение I тах на 113,6% ($p=0,02$), снижение активности СОД на 93,58% ($p=0,02$) и каталазы на 54,67% ($p=0,05$) по сравнению с полученными значениями в крови крыс инфантильного возраста (группа «1 месяц»). Количество ТК в группе «4 месяца» на 75% выше ($p=0,025$), ДС на 223,1% выше ($p=0,025$), МДА 66,7% выше ($p=0,034$), полученных значений в группе «2 месяца».

Процессы ОМБ в плазме крови крыс разного возраста характеризовались увеличением карбонильных производных белков в плазме крови крыс в период полового созревания от инфантильного (1 месяц) к пубертатному возрасту (4 месяца) (рис. 4 и рис. 5): кДнфг на 477,7% ($p=0,046$), аДнфг_{инд.} на 278,12% ($p=0,046$) и кДнфг_{инд.} на 253% ($p=0,046$).

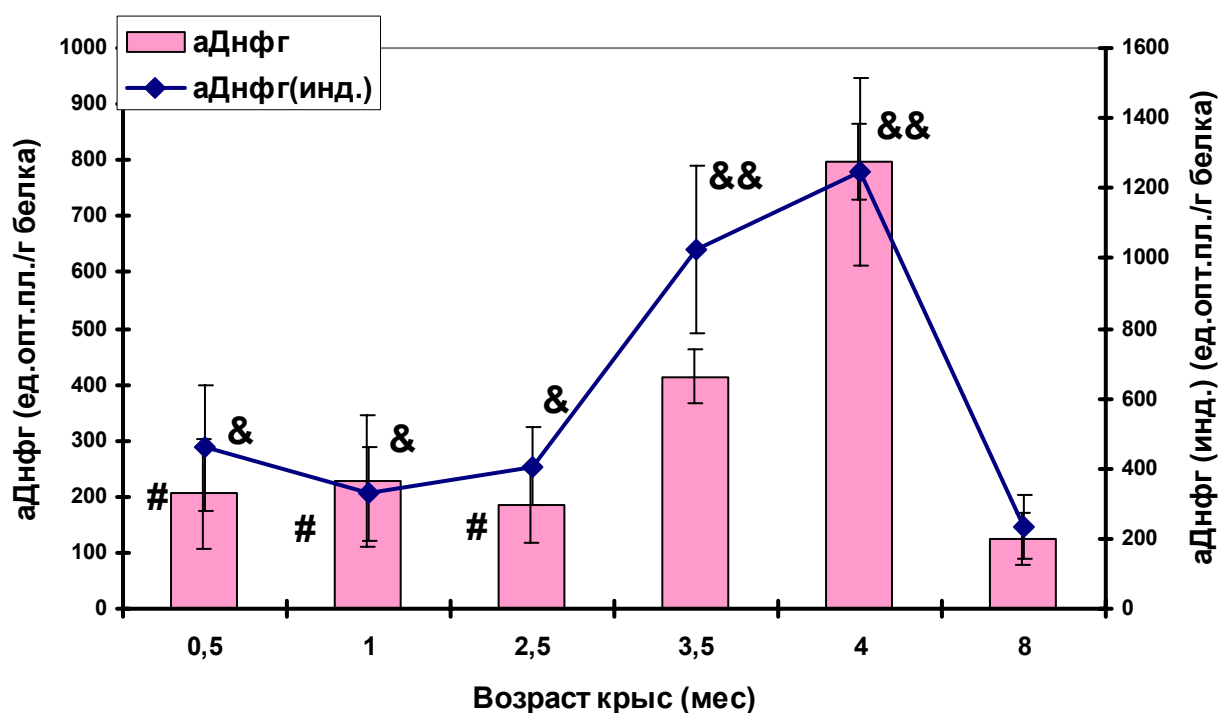


Рис. 4. Количество альдегид-динитрофенилгидразонов (аДнфг) при спонтанном и индуцированном окислении белка в плазме крови крыс разных возрастных групп, отличия статистически значимы при парном сравнении по критерию Манна – Уитни: # - с группой «3,5 мес» при спонтанном ОМБ; & - с группой «3,5 месяца», && - с группой «1 мес» при индуцированном ОМБ, ($p<0,05$).

Полученные результаты согласуются с данными И.А. Волчегорского и соавт. (2007), которые считают, что накопление продуктов ОМБ в стволовых структурах головного мозга и «древней коре» в период 12 – 21 год у человека

можно рассматривать как вероятностный механизм онтогенетического становления систем нейроэндокринной регуляции. Процесс созревания этих систем связан со свободнорадикальной модификацией рецепторов гипоталамуса и гиппокампа и снижением их чувствительности к эндокринным сигналам «отрицательной обратной связи».

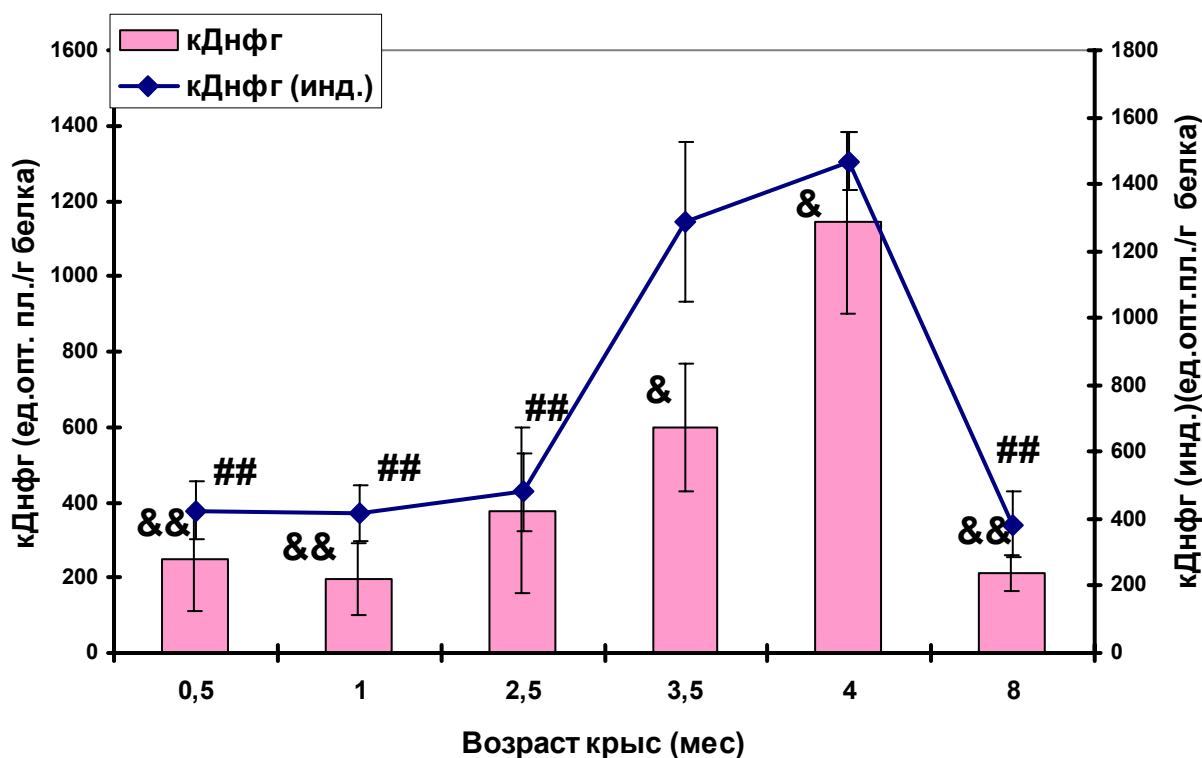


Рис. 5. Количество кетон-динитрофенилгидразонов (кДнфг) при спонтанном и индуцированном окислении белка в плазме крови крыс разных возрастных групп, отличия статистически значимы при парном сравнении по критерию Манна – Уитни: & - с группой «1 мес», && - с группой «3,5 мес» при спонтанном ОМБ; ## - с группой «3,5 месяца», при индуцированном ОМБ, ($p < 0,05$).

У самцов и самок (табл. 4) в 3,5 месяца в плазме крови выявлено повышение количества кДнфг, соответственно на 209,7% ($p=0,007$) и 244,3% ($p=0,011$) по сравнению с полученными значениями у крыс в возрасте 2 месяца. В группе самок в возрасте 3,5 месяца значение кДнфг на 145,75% больше ($p=0,005$) значения, полученного в группе самок в возрасте 2 месяца.

Происходило снижение количества пирувата в период полового созревания («3,5 мес») на 89,14% меньше ($p=0,02$), полученного значения в период молочного кормления. При анализе зависимости лактат/пируват в крови крыс разного возраста обнаружено увеличение этого соотношения в группе

крыс в возрасте 1,5 месяца ($173,12 \pm 11,6$) на 60,5% ($p=0,03$), в группе «3,5 месяца» на 215,38% ($p=0,05$) по сравнению с группой «1 месяц» ($107,86 \pm 3,95$).

У крыс в период полового созревания устойчивость эритроцитов к перекисному окислению липидов в модельной системе ниже, чем у животных периода молочного кормления и репродуктивного периода (табл. 3). Величина $tg(\alpha)_{эp}$, определенная методом индуцированной хемилюминесценции, связана с величиной антиоксидантного потенциала эритроцитов (Кузьмина Е.И., 1983). Происходило снижение устойчивости эритроцитов в группе «1,5 месяца» на 81% ($p=0,004$) от полученного значения в группе «8 месяцев». Наименьшая устойчивость эритроцитов к перекисному окислению липидов была характерна для эритроцитов крови крыс в возрасте 3 месяца на 90% ниже ($p=0,006$) и в возрасте 4 месяца на 52% ниже ($p=0,006$), полученного в группе «8 месяцев».

В крови крыс в возрасте 8 месяцев выявлены наименьшие значения показателей (табл. 3): I max - ($0,38 \pm 0,07$) отн.ед., oAOA - ($0,07 \pm 0,01$) отн.ед., ДК - ($0,07 \pm 0,02$) ед.опт.пл./ОЛ, ТК - ($0,03 \pm 0,00$) ед.опт.пл./ОЛ. В крови крыс репродуктивного периода количество пирувата на 66,7% ниже ($p=0,025$), полученного значения в период молочного кормления. В группе «8 месяцев» установлено наибольшее значение перекисной резистентности эритроцитов. В крови крыс в возрасте 9 месяцев выявлено увеличение I max на 92% ($p=0,02$), ТК на 33,33% ($p=0,027$), снижение активности СОД на 78% ($p=0,007$) по сравнению с группой «8 месяцев». Выявлено снижение устойчивости эритроцитов к перекисному окислению липидов у крыс в возрасте 9 месяцев по сравнению с животными в возрасте 8 месяцев, значение $tg(\alpha)_{эp}$ на 81% ниже ($p=0,003$).

Таким образом, выявлено снижение окислительных процессов в крови крыс от периода молочного кормления к репродуктивному периоду. В период полового созревания в крови крыс выявлено увеличение свободнорадикальных процессов на фоне снижения общей антиоксидантной активности, увеличение карбонильных производных белков, количества лактата. В репродуктивный период выявлена наибольшая перекисная резистентность эритроцитов. У крыс в возрасте 9 месяцев выявлено увеличение показателей свободнорадикального окисления и снижение перекисной резистентности эритроцитов.

Выделяют три основные роли свободнорадикального окисления в организме. Это, во-первых, образование АФК и свободнорадикальный процесс, как естественные физиологические функции в клетке. Вторая роль АФК, как повреждающего фактора при чрезмерной интенсификации свободнорадикального окисления, наиболее известна. Третья роль АФК связана с тем, что в физиологических концентрациях они выступают в качестве

сигнальных молекул в реакциях адаптации организма, играют важнейшую роль, участвуя в ключевых регуляторных механизмах живой клетки (Сазонтова Т.Г., 2004; Дубинина Е.Е., 2001). Вероятно, полученные нами возрастные изменения окислительных процессов обусловлены возрастными изменениями функционального состояния звеньев гипоталамо–гипофизарно-адренкортикальной системы (Дильман В.М., 1986). Снижение значений показателей окислительных процессов от молочного периода к репродуктивному, вероятно, связано с увеличением адаптационного порога чувствительности гипоталамуса, которое предположительно связывают либо с уменьшением числа антенн - рецепторов на мембране клеток соответствующего гипоталамического центра, либо с уменьшением выработки нейромедиаторов (Carroll В.І., 2002). Из-за снижения чувствительности гипоталамуса к стресс-факторам и, связанного с этим снижения уровня образования АФК, при старении организма уменьшается устойчивость клеток и способность эффективно адаптироваться к быстро изменяющимся условиям окружающей среды, что и приводит к развитию самоускоряющихся патологических процессов под действием экстремальных факторов, в том числе и окислительных. Симптомы старости проявляются уже в конце репродуктивного периода и становятся все более интенсивными по мере дальнейшего старения (Москалев А.А., 2008; Хавинсон В.Х., 2009).

3. Функциональное состояние ЦНС и процессы свободнорадикального окисления в ткани головного мозга и крови крыс препубертатного возраста

В третьей серии экспериментов проведено исследование особенностей функционального состояния ЦНС и интенсивности свободнорадикальных процессов в ткани головного мозга и крови крыс в период полового созревания - критический период онтогенеза. Эксперименты были проведены **на самцах и самках** препубертатного I (2 месяца) и препубертатного II (3,5 месяца) возраста (табл. 4). Изучение поведенческих реакций крыс в тесте «открытое поле» и интенсивности свободнорадикальных процессов показало зависимость изучаемых показателей от пола животных. Полученные нами различия в поведенческой активности крыс, интенсивности свободнорадикальных процессов в ткани головного мозга и крови крыс, корреляционные взаимосвязи физиологических и биохимических показателей, возможно, обусловлены влиянием половых гормонов.

По протоколам наблюдений за крысами в тесте «открытое поле» определяли:

- изменение горизонтальной двигательной активности (ГДА) – общее количество пересеченных квадратов;

- изменение ориентировочно-исследовательской активности, которая характеризовалась количеством пересеченных центральных квадратов (ПЦК) и количеством вертикальных стоек - показателем вертикальной двигательной активности (ВДА) (Шульговский В.В., 2003);

- изменение уровня тревожности, которое характеризовалось общим временем реакции замирания (ВРЗ) у крыс;

- изменение эмоционального состояния, которое характеризовалось количеством актов груминга (Г) у крыс (Кулагин Д.А., 1969; Поживалов В.П., 1978; Шульговский В.В., 2003).

Напряжение эмоционального состояния у **самцов** в возрасте 2 месяца (табл. 4), вероятно, связано с резким повышением активности центрального звена эндокринной системы (гипоталамуса) в связи с началом полового созревания, преобладанием процессов возбуждения в подкорковых структурах и понижением тормозящего влияния коры головного мозга (Фарбер Д.А. и др., 1990). Интенсивность свободнорадикальных процессов в ткани головного мозга самцов в возрасте 2 месяца выше по сравнению с самками этого же возраста и самцами 3,5 месяцев. Интенсивность свободнорадикальных процессов в крови самцов в возрасте 2 месяца выше по сравнению с самками в возрасте 2 месяца (табл. 4). Полученные данные, вероятно, связаны с более поздним началом полового созревания у самцов.

У **самок** в возрасте 3,5 месяца выявлено увеличение времени реакции замирания в тесте «открытое поле» и повышение интенсивности СРО в крови по сравнению с самцами и самками в возрасте 2 месяца, что, вероятно, обусловлено началом функционирования эстрального цикла. Эстрогены оказывают прямое стимулирующее влияние на промотор гена, ответственного за синтез кортикотропин-рилизинг-гормона, и норадренергические структуры в центральной нервной системе. Репродуктивная система посредством эстрадиола оказывает положительное обратное влияние на оба звена стрессовой системы, стимулируя секрецию кортикотропин-рилизинг-гормона и подавляя обратный захват и расщепление катехоламинов (Акоев И.Г., 1985). Тоническая система у обоих полов поддерживает базальные уровни гипофизарных гормонов в крови, которые обеспечивают развитие как половых клеток, так и эндокринных элементов гонад. Циклическая система в отличие от тонической функционирует довольно кратковременно, причем ее действие проявляется лишь на протяжении 12-24 часов в течение каждого полового цикла самки. Такой волнообразный (циклический) характер секреции вызывает крайне

выраженное (иногда в сотни раз) увеличение содержания гонадотропина в крови, главной функцией которого является индукция овуляции у самки (Скопичев В.Г., 2007).

Физиологические особенности в препубертатный возраст не влияют на процессы формирования условного рефлекса пассивного избегания (временной связи между условным сигналом и безусловной реакцией), на сохранение в мозге следовых процессов, которые сформировались на нейрональных центрах во время обучения (рис. 6).

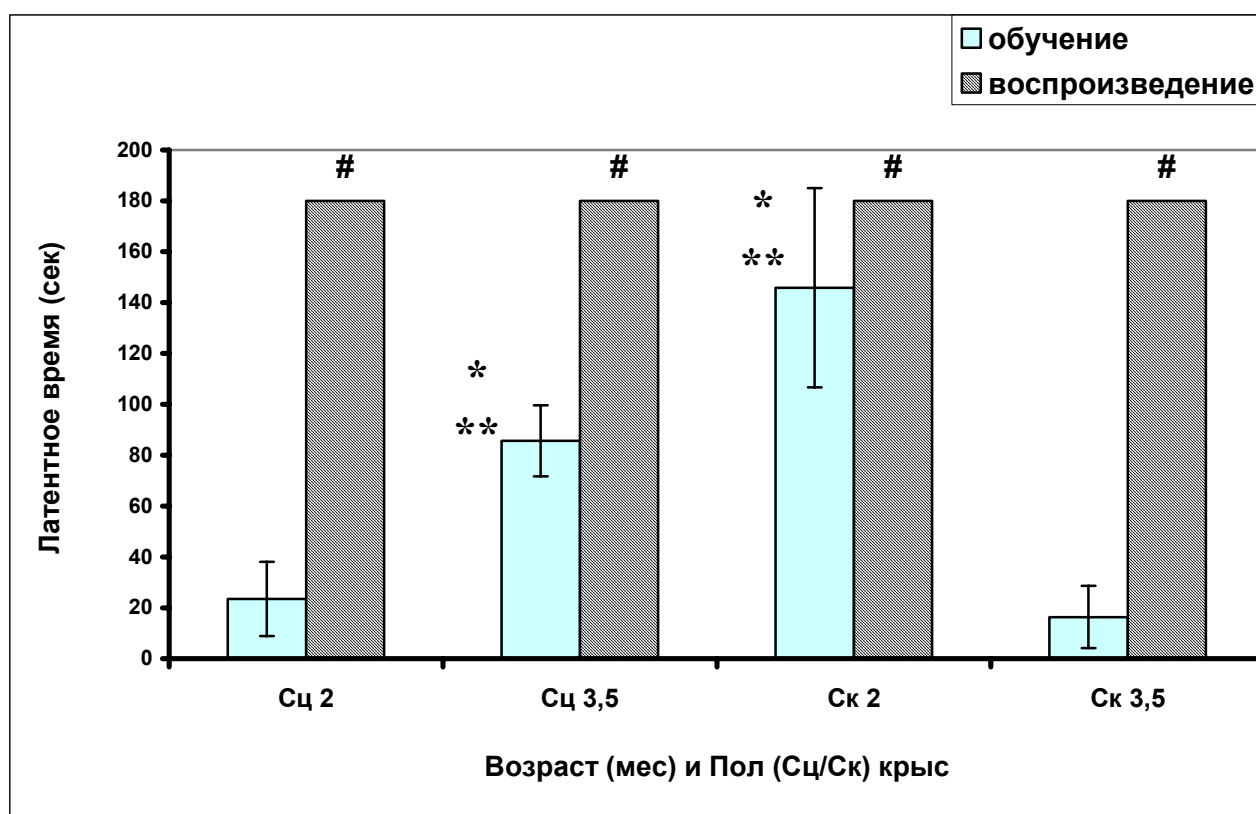


Рис. 6. Латентное время входа в темный отсек при обучении и воспроизведении навыка пассивного избегания у крыс препубертатного возраста: Сц – самцы, Ск – самки. Статистически значимые отличия по критерию Манна – Уитни: *- от группы «самцы 2 месяца»; ** - от группы «самцы 3,5 месяца»; статистически значимые отличия по критерию Вилкоксона # - от латентного времени при обучении, $p < 0,05$.

В нашем исследовании выявлена корреляционная взаимосвязь поведенческих реакций крыс в тесте «открытое поле» и показателей ПОЛ у крыс препубертатного возраста. Согласно проведенному корреляционному анализу, вариабельность ориентировочно-исследовательской активности крыс преимущественно находилась в прямой зависимости от активности

антиоксидантных ферментов в ткани головного мозга (каталаза: $r=0,87$ ($p=0,001$); СОД: $r=0,90$ ($p=0,04$)) и в обратной корреляции с изменением молекулярных продуктов ПОЛ в ткани головного мозга (ДК: $r=-0,81$ ($p=0,05$); ТК: $r=-0,93$ ($p=0,01$)) и в крови крыс (ДК: $r=-0,83$ ($p=0,04$); МДА: $r=-0,84$ ($p=0,04$)). Эмоциональное состояние животных находилось в прямой корреляционной зависимости от изменения количества МДА в ткани головного мозга крыс ($r=0,85$ ($p=0,002$)), в обратной - от изменения активности СОД в ткани головного мозга ($r=-0,88$ ($p=0,02$)) и активности АОС в крови крыс (оАОА: $r=-0,71$ ($p=0,03$); каталаза: $r=-0,73$ ($p=0,02$)). Изменение горизонтальной двигательной активности крыс не зависело от изменения свободнорадикальных процессов в ткани головного мозга и находилось в обратной корреляционной взаимосвязи с изменением интенсивности свободнорадикальных процессов в крови (каталаза: $r=0,73$ ($p=0,02$); МДА: $r=-0,83$ ($p=0,04$)). Полученные корреляционные связи, возможно, обусловлены не взаимным влиянием изучаемых показателей друг на друга, а наличием третьего фактора, а именно гормональным статусом организма крыс в период полового созревания (Безруких М.М., 2008; Дедов И.И., 2008).

ВЫВОДЫ

1. Установлено снижение окислительных процессов в ткани головного мозга и крови крыс от периода молочного кормления (возраст 0,5 месяцев) к репродуктивному периоду (возраст 5-8 месяцев), которое характеризовалось снижением показателей перекисного окисления липидов, антиоксидантной активности и углеводного обмена.

2. В период полового созревания (возраст 1-4 месяца) выявлено увеличение продуктов перекисного окисления липидов на фоне снижения антиоксидантной активности, снижение устойчивости мембран эритроцитов к перекисному окислению, увеличение карбонильных производных белков в крови, накопление лактата в ткани головного мозга и крови крыс.

3. В репродуктивном периоде выявлено повышение интенсивности свободнорадикальных процессов в ткани головного мозга и крови крыс от молодого (8 месяцев) к зрелому возрасту (12 месяцев) при отсутствии изменений в возрасте 5 - 8 месяцев.

4. Установлено, что половая принадлежность животных препубертатного возраста оказывает влияние на интенсивность свободнорадикальных процессов в ткани головного мозга и крови и поведенческие реакции крыс в тесте «открытое поле» и не оказывает влияния на процессы консолидации памяти при воспроизведении условного рефлекса пассивного избегания. У самцов в возрасте 2 и 3,5 месяца интенсивность

свободнорадикальных процессов в ткани головного мозга выше, чем у самок этого же возраста. У самок в возрасте 3,5 месяца интенсивность свободнорадикальных процессов в крови выше, чем у самцов. В тесте «открытое поле» у 2- месячных самцов наблюдали повышение эмоциональности; у самок в возрасте 3,5 месяца повышение тревожности, о чем свидетельствовало увеличение времени реакции замирания.

5. Выявлена обратная корреляционная зависимость между показателями свободнорадикальной активности и поведенческими реакциями крыс препубертатного возраста в тесте «открытое поле»: интенсивность свободнорадикальных процессов в крови - горизонтальная двигательная активность; интенсивность свободнорадикальных процессов в ткани головного мозга и крови - ориентировочно-исследовательская активность; антиоксидантная активность в ткани головного мозга и крови – эмоциональнальное состояние.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Samochvalova J.V.**, Mukhina I.V., Lbova O.E. Age-dependent modification of lipid peroxidation parameteres in rats brain // *Advances in Gerontology*. - Saint Petersburg, 2001. - Vol. 6. - P. 62.
2. **Никитина Ю.В.** Окислительная модификация белков в плазме крови крыс разного возраста // Тезисы 10 Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» - «Фундаментальная и клиническая медицина» - Санкт-Петербург, 2007.- С. 305 - 306.
3. **Никитина Ю.В.**, Мухина И.В. Возрастные изменения окислительной модификации белков плазмы крови крыс // Тезисы докладов 20 съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова. - М.: Изд. дом «Русский врач», 2007.- С. 354.
4. **Никитина Ю.В.**, Мухина И.В. Возрастные изменения окислительных процессов в ткани головного мозга и крови крыс // Нижегородский медицинский журнал. – Нижний Новгород, 2008. - № 3, С. 152-153.
5. **Никитина Ю.В.**, Мухина И.В. Изменения окислительных процессов в ткани головного мозга и крови крыс в раннем онтогенезе // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. – Нижний Новгород, 2009. - № 6, С. 102-106.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АОА – антиоксидантная активность
АОС – антиоксидантная система
АФК – активные формы кислорода
аДнфг – альдегид-динитрофенилгидразоны
ВДА – вертикальная двигательная активность
ВРЗ – время реакции замирания
Г - груминг
ГДА – горизонтальная двигательная активность
ДК – диеновые конъюгаты
ДС – двойные связи
кДнфг – кетон- динитрофенилгидразоны
МДА – малоновый диальдегид
ОМБ – окислительная модификация белков
ПОЛ – перекисное окисление липидов
ПЦК – количество пересеченных центральных квадратов
СОД – супероксиддисмутаза
СРО – свободнорадикальное окисление
Сц / Ск – самцы / самки
ТК – триеновые конъюгаты
УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания
ХЛ – хемиллюминесценция
ЦНС – центральная нервная система
 $\text{tg}(\alpha)_{\text{эр}}$ – тангенс угла наклона кривой хемиллюминесценции