

На правах рукописи

ЗАЕВА ОЛЬГА БОРИСОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ
КРОВИ И СЛИЗИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА**

03.00.13 – физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Томск- 2007

Работа выполнена в отделе физиологии НИИ биологии и биофизики
Томского государственного университета

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Кривова Наталья Андреевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Васильев Владимир Николаевич

доктор медицинских наук, профессор
Морозов Игорь Александрович

Ведущая организация: Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН
г. Санкт-Петербург

Защита состоится «28» марта 2007г. в _____ часов
на заседании диссертационного совета Д 212.267.10
Томского государственного университета
(634050 г. Томск, пр. Ленина,36)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Томского
государственного университета

Автореферат разослан « ____ » _____ 2007г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат биологических наук

Е.Ю. Просекина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и постановка проблемы. Актуальность исследования определяется все возрастающим пониманием роли многокомпонентной антирадикальной системы для защиты организма от токсического действия радикалов внешней и внутренней среды. Многочисленными исследованиями показаны физиологические функции и метаболизм активных форм кислорода в организме человека и животных (Величковский Б.Т., 2000; Воейков В.Л., 2003; Капелько В.И., 2003; Владимиров Ю.А., 2004; Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1992; De Lamirande E. et al. 1993; Levin G., Popov J. 1994; Sawyer D.T. et al., 1996; Xia Y., Zweier J.L., 1997; A M. Saran et al. 2000).

Установлено, что в основе канцерогенеза, атеросклероза, хронических воспалений, нервных дегенеративных заболеваний лежит токсичное действие вторичных радикалов, образовавшихся в результате метаболических процессов (Сучков В.П. и соавт., 1978; Владимиров Ю.А., 1998; Кольтовер В.К., 1998; Хавинсон В.Х. и соавт., 2003; Manning A. et al., 1984; Pacifici R.E., Davies K.J.A., 1991; Pierpaoli W. et al., 1994; Tokumaru S. et al., 1996).

В то же время еще очень многие стороны антиоксидантной защиты организма остаются малоизученными. Так, радикалы из внешней среды поступают через открытые системы организма (дыхательную, пищеварительную, мочеполовую), однако механизмы антирадикальной защиты этих систем почти неизвестны. Отсутствуют сравнительные данные о состоянии антирадикальной активности плазмы крови и других систем организма у разных видов.

В настоящее время установлена антиоксидантная активность многих ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидазы, глутатионредуктаза и др.), продуктов метаболизма (белки сыворотки крови, стероидные гормоны, женские половые гормоны, убихинон и др.),

пищевых веществ и напитков (фрукты, овощи, зеленый чай, растительные масла и др.) (Клебанов Г.И. и соавт., 1988; Теселкин Ю.О., 1997; Frigg M. et al., 1983; Jenkins M.Y. et al., 1986; Yi O.S. et al., 1991; Meister A., 1992; Lissi E. et al., 1992; Li-Chag Lu et al., 2003; Huang D.-J. et al., 2004).

Однако для некоторых тканей и систем пока не установлены конкретные носители антиоксидантной активности, т.е. не определены прямые корреляции между уровнем антиоксидантной активности той или иной системы и ее структурными компонентами.

Реакции образования и удаления активных форм кислорода и других радикалов (гидроксильный радикал, супероксид, липоксильный радикал, пероксинитрит и другие) обеспечиваются различными механизмами, объединенными в антиоксидантную систему организма (Владимиров Ю.А., 2004; Carrell R.W. et al., 1975; Levin G., Popov J., 1994).

Взаимодействия между отдельными звеньями антиоксидантной системы в настоящее время широко исследуются (Воейков В.Л., 2003; Капелько В.И., 2003; Poovaiah B.P. et al., 1986; Pacifici R.E., Davies K.J.A., 1991; Yi O.S. et al., 1991), однако ясности в этом вопросе пока нет, что определяется сложностью и неоднозначностью интерпретации результатов (Levin G., Popov J., 1994).

Поэтому особое значение приобретают методы исследования антиоксидантной активности биологических субстратов. Все существующие методы оценки радикальных реакций делятся на косвенные и прямые (Владимиров Ю.А., 1998; Vladimirov Y.A., Putvinsky A.V., 1992).

Наиболее информативными являются прямые методы исследования радикалов, к которым относятся метод электронного парамагнитного резонанса и метод хемилюминесценции. Хемилюминесцентный метод основан на механизме выделения фотонов в результате взаимодействия радикалов друг с другом. Интенсивность свечения пропорциональна

скорости реакции в естественных условиях, без специальной подготовки исследуемого материала. Эти положительные стороны хемилюминесцентного метода объясняют его широкое применение в самых разных областях (Величковский Б.Т., 2000; Воейков В.Л., 2003; Владимирова Ю.А., 2004; Lissi E. et al., 1992). В настоящее время существует огромное количество модификаций хемилюминесцентного метода, предназначенного для конкретных субстратов (Клебанов Г.И. и соавт., 1988; Теселкин Ю.О. и соавт., 1997; Lissi E. et al., 1992; Parejo J. et al., 2000; Akiyama Y. et al., 2001).

Именно большое количество модификаций затрудняет сравнительный анализ уровней антиоксидантной активности в разных субстратах.

Цель работы: Исследовать антирадикальную и антиоксидантную активность плазмы крови и пищеварительных секретов у теплокровных животных.

Задачи исследования:

1. Подобрать состав стандартного раствора для хемилюминесцентного анализа, позволяющего проводить исследования в различных биологических субстратах;
2. Провести сравнительное исследование антиоксидантной и антирадикальной активности различных биологических субстратов и их комплексов;
3. Исследовать видовые особенности антиоксидантной и антирадикальной активности плазмы крови у млекопитающих (человек, собака, мышь) и птиц (бройлер);
4. Исследовать возрастные особенности антиоксидантной и антирадикальной активности плазмы крови бройлеров;
5. Исследовать корреляционные зависимости антирадикальной активности и биохимического состава компонентов пристеночного слизистого слоя различных отделов пищеварительного тракта у

собак.

Научная новизна. Впервые установлено, что в биологических субстратах, таких, как плазма крови и слизь пищеварительного тракта, присутствует система защиты организма от действия радикалов внешней и внутренней среды, состоящая из двух частей: антиоксидантной активности (защита от действия активных форм кислорода) и антирадикальной активности (защита от действия радикалов различной природы). Причем уровень антирадикальной активности на два порядка выше уровня антиоксидантной активности. Впервые установлены видовые особенности антиоксидантной и антирадикальной активности плазмы крови у разных видов теплокровных животных (человек, собака, мышь, бройлер). Впервые установлены некоторые механизмы, обуславливающие антирадикальную активность пищеварительного тракта.

Практическая значимость. Предложен модифицированный метод ингибирования люминолзависимой хемилюминесценции, который может быть использован для широкого круга исследований антирадикальной и антиоксидантной активности различных биологических субстратов. Установленные закономерности взаимодействия напитков, содержащих алкоголь, со слизью желудка и плазмой крови, могут стать физиологическим обоснованием здорового образа жизни.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Использование двух источников (дифенилпикрилгидразил и фитонцидная фракция), генерирующих радикалы, позволило установить два вида защиты организма от действия радикалов: антиоксидантную активность и антирадикальную активность;
2. Основными носителями антирадикальной активности пристеночного слизистого слоя пищеварительного тракта у собак являются белок, N-ацетилнейраминовая кислота полимеризованных гликопротеинов и гексоамины деградированных молекул гликопротеинов слизи;

3. Метод позволяет проводить сравнительные исследования антиоксидантной и антирадикальной активности в различных биологических субстратах.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены на International Symposium on Science and Technology (Tomsk, 2001); IV Съезде физиологов Сибири (Новосибирск, 2002); 7-th Korea-Russia International Symposium on Science and Technology (Ulsan, Korea, 2003); I Съезде физиологов СНГ (Сочи, Дагомыс, 2005); на Всероссийской научной конференции «Механизмы адаптации организма» (Томск, 2006).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ. Из них 5 статей в центральной печати.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка используемой литературы. Работа изложена на 128 страницах машинописного текста, включает 15 таблиц и 16 рисунков.

Вклад автора. Работа выполнена в отделе физиологии НИИ биологии и биофизики ТГУ под научным руководством доктора биологических наук, профессора Н.А. Кривовой, которой диссертант выражает глубокую благодарность и признательность. Автор выражает благодарность кандидату физико-математических наук, старшему научному сотруднику ОСП СФТИ ТГУ Светличному В.А. за содействие в выполнении работы. Все результаты получены автором самостоятельно. Забор плазмы крови и слизи желудка у человека проводился на базе ОКБ г. Томска.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы исследования. В острых опытах использовали собак, мышей, бройлеров. Были поставлены следующие серии экспериментов:

1) исследование антиоксидантной и антирадикальной активности плазмы крови, гомогената слизи желудочно-кишечного тракта, спиртосодержащих напитков (бальзам, ликер, водка и коньяк) и их комплексов в условиях *in vitro*;

2) исследование видовых особенностей антиоксидантной активности и антирадикальной активности плазмы крови млекопитающих (человек, собака, мышь) и домашней птицы (бройлер);

3) исследование возрастных особенностей антиоксидантной активности и антирадикальной активности плазмы крови бройлеров породы кросс ИЗА (1 группа – 20 однодневных цыплят, 2 группа – 60 бройлеров в возрасте 38 дней и 3 группа – 20 бройлеров в возрасте 260-ти дней);

4) исследование антирадикальной активности и биохимического состава полимеризованных и внеструктурных компонентов пристеночного слизистого слоя различных отделов желудочно-кишечного тракта у собак.

Исследования проводились в острых опытах на 12 собаках, 13 мышах и 100 бройлерах.

Методы исследования антирадикальной и антиоксидантной активности. Антирадикальную и антиоксидантную активность определяли по принципу метода ингибирования люминолзависимой хемилюминесценции, который в настоящее время получил широкое распространение. Имеется большое количество работ, где для исследования активности антиоксидантов, содержащихся в биологических жидкостях, в качестве субстрата, генерирующего активные формы кислорода, были использованы различные субстанции (Клебанов Г.И. и соавт., 1988; Владимиров Ю.А., 1998; Хавинсон В.Х. и соавт., 2003; Lissi E. et al., 1992; Smith R. et al., 1996; Cao G. et al., 1999; 2000;).

Наши исследования были направлены на определение интегральных

показателей антирадикальной и антиоксидантной активности различных биологических субстратов.

Для исследования активности антиоксидантов, как эндогенных, так и экзогенных, были важны следующие условия:

1) Возможность проведения сравнительных исследований активности как эндогенных антиоксидантов, содержащихся в биологических образцах (плазма крови, гомогенат слизи пищеварительного тракта), так и экзогенных, содержащихся в различных напитках и пищевых продуктах, биологически активных добавках, фармакологических препаратах;

2) Соотношение растворов (стандартный раствор: исследуемый материал) должно быть таким, чтобы высокомолекулярные соединения плазмы крови и слизи пищеварительного тракта (белки и гликопротеины) не преципитировали и не подвергались расщеплению, что могло бы привести к изменению их нативных свойств;

3) Составы стандартных (контрольных) растворов реагирующих смесей должны обеспечивать стабильный уровень хемиллюминесценции, так называемое плато максимальной хемиллюминесценции стандартных растворов должно оставаться стабильным в течение как минимум 90 секунд;

4) Метод должен позволять использовать различные источники радикалов активных форм кислорода и других атомов и молекул, что дало бы возможность сравнивать степень ингибирования радикалов, генерируемых этими источниками, эндогенными и экзогенными антиоксидантами;

5) Метод должен обладать высокой точностью и воспроизводимостью.

За основу предлагаемого нами метода было взято явление хемиллюминесценции (природная химическая реакция, сопровождающая процессы гниения). Развитие современной техники дает возможность воспроизвести этот процесс в лабораторных условиях.

В проведенных исследованиях для хемилюминесцентного метода были использованы следующие составы стандартных растворов: для определения антиоксидантной активности - 16 мл дистиллированной воды (подогретой до 38⁰С), 1,25мМ раствор DPPH в этаноле, 0,01Н раствор люминола в фосфатном буфере и перекись водорода; для определения антирадикальной активности - 16 мл дистиллированной воды (подогретой до 38⁰С), фитонцидная фракция, 0,01Н раствор люминола в фосфатном буфере и перекись водорода.

Использование двух видов доноров радикалов (DPPH и фитонцидной фракции) дает возможность исследовать два вида защиты организма от действия радикалов различной природы: антиоксидантную активность, поскольку DPPH является донором только супероксид аниона, и антирадикальную активность, поскольку по своему составу фитонцидная фракция представляет собой смесь органических кислот, углеводов и фенольных соединений (Костеша Н.Я. и соавт., 2007) и поэтому может быть донором фенильных, метильных, этильных, бензильных, алкильных и других радикалов.

Наши исследования проводились на хемилюминометре, работающем в режиме счета фотонов, ФЭУ и в программном обеспечении производства «Ангстрем». Камера для кювет, обеспечивающая термостатирование (t 37⁰С) и перемешивание разработана в отделе фотоники молекул Сибирского физико-технического института. Время экспозиции 0,1 секунды.

Благодаря высокой чувствительности прибора для определения антиоксидантной и антирадикальной активности было достаточно 50 мкл исследуемой пробы.

Определение антиоксидантной и антирадикальной активности проводили в следующей последовательности:

- 1) подготавливали четыре кюветы;

- 2) в первую кювету, которая служила контролем, добавляли 50 мкл дистиллированной H₂O, а в три последующие по 50 мкл исследуемой пробы;
- 3) ex tempore готовили стандартный раствор (с DPPH или фитонцидной фракцией) и в каждую кювету добавляли по 4 мл приготовленного раствора;
- 4) кюветы помещали в камеру хемиллюминометра и последовательно через каждые 10 секунд измеряли степень тушения реакции хемиллюминесценции трех исследуемых проб против контрольной.

Измерения проводились трижды, на максимальном плато свечения контрольного образца, которое наблюдалось в течение 90 секунд.

Антиоксидантную и антирадикальную активность опытной пробы рассчитывали как среднюю величину из трех замеров.

Количественные величины антиоксидантной активности (АОА) и антирадикальной активности (АРА) выражали в (фотонах/мл)/сек и вычисляли по формуле:

$$\text{АОА или (АРА)} = (J^0 - J) \cdot n/t$$

где: J^0 – количество регистрируемых фотонов контрольной пробы;

J – количество регистрируемых фотонов опытной пробы;

n – разведение пробы;

t – время экспозиции.

Методы исследования биохимического состава пристеночного слизистого слоя. Состав пристеночной слизи исследовали с помощью комплекса методов. Пробу нативной пристеночной слизи подвергали процедуре очистки и выделения полимеризованных гликопротеинов, при этом внеструктурные компоненты переходили в раствор в нативном виде, что важно для их последующего определения. Определение биохимического состава полимеризованных и деградированных гликопротеинов описано в монографии Кривовой Н.А., Дамбаева Г.Ц.,

Хитрихеева В.Е. (2002). Результаты пересчитывали на мл того объема, который занимали структурные гликопротеины в пристеночном слизистом слое. Для характеристики состава структурных гликопротеинов рассчитывали суммарную концентрацию всех моносахаров, её отношение на мг белка, что позволяет оценить степень гликозилирования молекулы гликопротеина.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с применением распространенных методов вариационной статистики. Достоверность различий между выборками определяли при помощи критерия Манн-Уитни используя программу «Statistica 6,0».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки действия экзогенных антиоксидантов на защитные механизмы организма проводили сравнительное изучение антиокислительных свойств слизистого геля желудочно-кишечного тракта, плазмы крови и их комплексов с различными напитками.

Предлагаемый метод был апробирован при исследовании антиоксидантной и антирадикальной активности в различных алкогольных напитках, плазме крови и гомогенате полостной слизи желудка здорового человека (табл. 1, 2).

В качестве источников радикалов использовали дифенилпикрил-гидразил и фитонцидную фракцию.

Из алкогольных напитков были выбраны следующие:

- 1) Горно-Алтайский бальзам (45% алкоголя), Россия, Горно-Алтайск;
- 2) Черно-смородиновый ликер (16% алкоголя), Франция;
- 3) Коньяк «Белый аист» (45% алкоголя), Молдова;
- 4) Водка «Исток» (40% алкоголя), Россия, Томск.

Таблица 1. Антиоксидантная [(фотонов/мл)/сек] и антирадикальная [(фотонов/мл)/сек] активность плазмы крови и гомогената слизи желудка здорового человека

Биологическая жидкость	Антиоксидантная активность	Антирадикальная активность
плазма крови (n=8)	$56,6 \cdot 10^6 \pm 4,8 \cdot 10^6$	$4362 \cdot 10^6 \pm 534 \cdot 10^6$
слизь желудка (n=8)	$10,0 \cdot 10^6 \pm 2,4 \cdot 10^6$	$1521 \cdot 10^6 \pm 208 \cdot 10^6$

Из приведенных в таблице данных видно, что уровень антиоксидантной активности плазмы крови человека в 5-6 раз выше, чем слизи желудка, а уровень антирадикальной активности (соответственно) – почти в 3 раза. Но, учитывая высокую скорость обновления слизи желудочно-кишечного тракта (4 раза в сутки), можно считать, что вклад антиоксидантов желудочной слизи в общую систему антиоксидантной защиты организма весьма значителен.

Стандартные растворы, содержащие DPPH или фитонцидную фракцию имеют исходную хемилюминесценцию, различающуюся на два порядка. В данных опытах полученные результаты показывают, что и в плазме крови, и в слизи желудка имеются механизмы, активно подавляющие хемилюминесценцию стандартного раствора, содержащего DPPH или фитонцидную фракцию.

Было принято, что тушение хемилюминесценции стандартного раствора, содержащего DPPH, обусловлено механизмами антиоксидантной защиты. А тушение хемилюминесценции стандартного раствора, содержащего фитонцидную фракцию, обусловлено механизмами антирадикальной защиты.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что плазма крови и секреты пищеварительного тракта обладают способностью тушить люминолзависимую хемилюминесценцию, индуцированную супероксид анионом и/или комплексом других радикалов.

Результаты исследования антиоксидантной и антирадикальной активности алкогольных напитков представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 видно, что антиоксидантная активность составляет от $0,098 \cdot 10^6$ (фотонов/мл)/сек у водки до $0,368 \cdot 10^6$ (фотонов/мл)/сек у черно-смородинового ликера, т.е. у водки антиоксидантная активность в 3,5 раза ниже. Коньяк антиоксидантной активностью не обладает.

Таблица 2. Антиоксидантная [(фотонов/мл)/сек] и антирадикальная [(фотонов/мл)/сек] активность алкогольных напитков

Алкогольный напиток	Антиоксидантная активность	Антирадикальная активность
Горно-Алтайский бальзам	$0,344 \cdot 10^6$	$96,5 \cdot 10^6$
Черно-смородинов. ликер	$0,368 \cdot 10^6$	$83,0 \cdot 10^6$
Коньяк «Белый аист»	не обладает	не обладает
Водка «Исток»	$0,098 \cdot 10^6$	не обладает

Среди этих же напитков антирадикальная активность была обнаружена только у Горно-Алтайского бальзама и черно-смородинового ликера. Следует отметить, что у Горно-Алтайского бальзама и черно-смородинового ликера уровень антирадикальной активности превышает уровень антиоксидантной активности в 250-300 раз.

Таким образом, напитки, содержащие высокую концентрацию алкоголя (коньяк и водка) не обладают антиоксидантной или антирадикальной активностью. Только для водки был показан низкий уровень антиоксидантной активности.

Напитки, также содержащие высокую концентрацию алкоголя, но представляющие собой настойки из одного или нескольких сибирских растений, обнаруживают собственный высокий уровень антиоксидантной и антирадикальной активности.

Помимо прямого определения антиоксидантной и антирадикальной активности биологических жидкостей и алкогольных напитков (табл. 1, 2) были проведены исследования антиоксидантной и антирадикальной активности комплексов этих напитков с гомогенатом слизи желудка или плазмой крови (табл. 3). Исследование этих взаимодействий прослеживает путь поступления веществ, содержащихся в напитках, через желудочно-кишечный тракт и дальнейшее их влияние на организм.

Было установлено (табл. 3), что антиоксидантная и антирадикальная активность плазмы крови и гомогената желудочной слизи изменяется после добавления различных напитков, причем эти изменения не полностью зависят от исходных показателей активности антиоксидантов самих напитков (табл. 2).

Из приведенных в таблице 3 данных видно, что антиоксидантная активность (источник радикалов дифенилпикрилгидразил) комплексов плазмы крови или гомогената слизи желудка с такими напитками, как Горно-Алтайский бальзам и черно-смородиновый ликер практически не изменяется по сравнению с контролем («плазма крови + д.Н₂О» и «слизь желудка + д.Н₂О»).

Незначительное снижение антиоксидантной активности прослеживается только в комплексе «плазма крови + водка», а комплексы «плазма крови + коньяк» и «слизь желудка + коньяк» показывают полное отсутствие антиоксидантной активности.

Таблица 3. Антиоксидантная и антирадикальная активность [(фотонов/мл)/сек] комплексов «плазма крови + напиток» и «слизь желудка + напиток» смешанных в соотношении (1:1)

Исследуемый комплекс	Антиоксидантная активность (n=8)	Антирадикальная активность (n=8)
плазма крови + д.Н ₂ О	$27,8 \cdot 10^6 \pm 2,4 \cdot 10^6$	$2460 \cdot 10^6 \pm 201 \cdot 10^6$
плазма крови + ГАБ	$28,9 \cdot 10^6 \pm 3,7 \cdot 10^6$	$4752 \cdot 10^6 \pm 471 \cdot 10^6*$
плазма крови + ЧСЛ	$28,3 \cdot 10^6 \pm 5,1 \cdot 10^6$	$4664 \cdot 10^6 \pm 174 \cdot 10^6*$
плазма крови + К	0	0
плазма крови + В	$23,1 \cdot 10^6 \pm 2,0 \cdot 10^6$	$2307 \cdot 10^6 \pm 254 \cdot 10^6$
слизь желудка + д.Н ₂ О	$5,0 \cdot 10^6 \pm 0,4 \cdot 10^6$	$725 \cdot 10^6 \pm 96 \cdot 10^6$
слизь желудка + ГАБ	$5,6 \cdot 10^6 \pm 0,8 \cdot 10^6$	$1407 \cdot 10^6 \pm 59 \cdot 10^6*$
слизь желудка + ЧСЛ	$4,8 \cdot 10^6 \pm 0,5 \cdot 10^6$	$1482 \cdot 10^6 \pm 31 \cdot 10^6*$
слизь желудка + К	0	$105 \cdot 10^6 \pm 8,7 \cdot 10^6*$
слизь желудка + В	$5,1 \cdot 10^6 \pm 0,1 \cdot 10^6$	$730 \cdot 10^6 \pm 29 \cdot 10^6$

ГАБ – Горно-Алтайский бальзам; ЧСЛ – Черно-смородиновый ликер; К – коньяк «Белый аист»; В – водка «Исток»

* - отличия достоверны по отношению к контролю «плазма крови + д.Н₂О» или «слизь желудка + д.Н₂О» ($p \leq 0,05$)

В данном случае, разведение (1:1) плазмы крови и гомогената желудочной слизи д.Н₂О и исследуемыми напитками снижает исходный уровень антиоксидантной активности биологических образцов (табл. 1) в два раза.

Результаты анализа антирадикальной активности (источник радикалов фитонцидная фракция) комплексов плазмы крови или гомогената слизи желудка с исследуемыми напитками представлены в таблице 3.

Антирадикальная активность исходного образца плазмы крови составляла $4362 \cdot 10^6 \pm 534 \cdot 10^6$ (фотонов/мл)/сек (табл. 1). Добавление д.Н₂О и водки к плазме крови вызывало снижение уровня антирадикальной активности в 2 раза по сравнению с исходным образцом плазмы крови, но это снижение также объясняется разведением последнего в 2 раза.

Разведение исходного образца плазмы крови Горно-Алтайским бальзамом или черно-смородиновым ликером, наоборот, вызывало увеличение антирадикальной активности этих комплексов по сравнению с контролем (комплекс «плазма крови + д. Н₂О») в 2 раза.

Коньяк при добавлении к плазме крови также генерирует собственные радикалы, т.е. антирадикальная активность в этом комплексе отсутствует.

Антирадикальная активность исходного образца гомогената слизи желудка составляла $1521 \cdot 10^6 \pm 208 \cdot 10^6$ (фотонов/мл)/сек (табл. 1). Динамика изменений антирадикальной активности исследуемых комплексов, образованных после добавления алкогольных напитков к гомогенату желудочной слизи, аналогична изменениям при смешивании плазмы крови с данными напитками. Очевидно, что добавление аликвоты дистиллированной Н₂О и водки к слизи желудка снизило этот показатель в 2 раза по сравнению с исходным образцом (табл. 1).

По результатам проведенных исследований можно сделать следующие заключения:

- 1) В условиях *in vitro* при добавлении к плазме крови или гомогенату слизи желудка алкогольных напитков происходит изменение уровня антиоксидантной и антирадикальной активности исходных образцов биологических жидкостей;
- 2) Антиоксидантная активность комплексов, образованных добавлением исследуемых напитков к плазме крови или гомогенату слизи желудка не изменяется по отношению к контролю;

3) Антирадикальная активность комплексов биологических жидкостей с Горно-Алтайским бальзамом или черно-смородиновым ликером увеличивается в 2 раза по сравнению с контролем, т.е. уровень антирадикальной активности этих комплексов равен уровню исходных образцов плазмы крови и гомогената желудочной слизи;

4) Степень выраженности данных изменений не связана с процентным содержанием алкоголя в исследуемых напитках;

5) Чтобы получить наиболее достоверную информацию об активности антиоксидантов, содержащихся в каком-либо препарате или биологическом образце, методом ингибирования люминолзависимой хемилюминесценции, использование одного источника радикалов недостаточно.

Таблица 4. Видовые особенности антиоксидантной и антирадикальной активности плазмы крови [(фотонов/мл)/сек]

Объекты исследования	Антиоксидантная активность	Антирадикальная активность
Человек (16-40 лет)	$56,6 \cdot 10^6 \pm 4,8 \cdot 10^6$ n=8	$4362 \cdot 10^6 \pm 534 \cdot 10^6$ n=8
Собаки (2-4 года)	$89,1 \cdot 10^6 \pm 9,1 \cdot 10^6$ * n=3	$10523 \cdot 10^6 \pm 110 \cdot 10^6$ * n=3
Мыши (90-95 суток)	$105,8 \cdot 10^6 \pm 13,7 \cdot 10^6$ * n=13	$7776 \cdot 10^6 \pm 843 \cdot 10^6$ * n=13
Бройлеры (260 дней)	$40,8 \cdot 10^6 \pm 2,2 \cdot 10^6$ * n=20	$3248 \cdot 10^6 \pm 275 \cdot 10^6$ n=20

Примечание: * - достоверность отличий по сравнению с уровнем антиоксидантной и антирадикальной активности у человека ($p \leq 0,05$)

Для сравнения видовых особенностей антиоксидантной и антирадикальной активности плазмы крови здорового человека и животных

были выбраны группы, достигшие половой зрелости (табл. 4).

Из приведенных в таблице 4 данных видно, что наиболее высокими уровнями антиоксидантной и антирадикальной активности плазмы крови обладают собаки и мыши.

Наиболее высокий показатель антиоксидантной активности плазмы крови был установлен у мышей, а антирадикальной активности - у собак, по сравнению с другими исследуемыми видовыми группами. Наиболее низкими уровнями антиоксидантной и антирадикальной активности плазмы крови обладают бройлеры.

Острые опыты по исследованию взаимосвязи антирадикальной активности пристеночного слизистого слоя с его структурными и внеструктурными компонентами были поставлены на 12 беспородных собаках-самцах в возрасте 2-4 лет и массой тела от 12 до 25 кг.

Состав структурных компонентов полимеризованных гликопротеинов и уровень их антирадикальной активности представлены в табл. 5. Из приведенных данных видно, что антирадикальная активность и состав полимеризованных гликопротеинов различаются в отделах пищеварительного тракта у собак. Так концентрация N-ацетилнейраминной кислоты в отделах тонкой кишки достоверно выше, чем в отделах желудка и толстой кишки. Концентрация галактозы и степень гликозилирования молекулы гликопротеина во всех отделах кишечника ниже, чем в желудке. Сумма моносахаров в отделах тонкой кишки ниже, чем в желудке и толстой кишке. И в желудке отмечена самая низкая антирадикальная активность.

Более высокий уровень антирадикальной активности очищенной слизи тонкого кишечника, по сравнению с желудком, можно объяснить отличиями в строении молекул гликопротеинов в желудке и кишечнике: в желудке молекула гликопротеина состоит из 4 субъединиц, а в тонком кишечнике – из 6 - 7 субъединиц (Allen A. et al., 1982). Изменение

содержания белка в молекуле гликопротеина в различных отделах пищеварительного тракта (в направлении от желудка к толстому кишечнику) соответствует изменению антирадикальной активности очищенной слизи (коэффициент корреляции равен 0,85) в данных отделах.

Вторым фактором, обеспечивающим антирадикальную активность полимеризованных гликопротеинов, по-видимому, является наличие в их составе N-ацетилнейраминовой кислоты, которая благодаря отрицательному заряду на своих остатках, делает молекулу гликопротеина поливалентным анионом. Изменение уровня антирадикальной активности полимеризованных гликопротеинов слизи пищеварительного канала в направлении от желудка к толстому кишечнику совпадает с изменением содержания в молекуле гликопротеина N-ацетилнейраминовой кислоты. Коэффициент корреляции между содержанием N-ацетилнейраминовой кислоты и уровнем антирадикальной активности равен 0,78.

Установлена также обратная взаимосвязь между уровнем антирадикальной активности полимеризованных гликопротеинов слизи различных отделов желудочно-кишечного тракта со степенью гликозилирования молекулы гликопротеина (коэффициент корреляции равен -0,81). Наиболее низкий уровень антирадикальной активности очищенных гликопротеинов желудка соответствует более высокой степени их гликозилирования в этом отделе пищеварительного канала. Низкая степень гликозилирования в тонком кишечнике (двенадцатиперстная кишка и тощая кишка) соответствует более высокому уровню антирадикальной активности полимеризованных гликопротеинов данных отделов (табл.5).

Взаимосвязи уровня антирадикальной активности очищенных гликопротеинов с содержанием в их составе гексозаминов, галактозы и фукозы не обнаружено.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что собственная антирадикальная активность гликопротеинов слизи зависит от структурных и пространственных особенностей их строения.

Помимо полимеризованных гликопротеинов в пристеночном слизистом слое находятся также частично или полностью деградированные гликопротеины, потерявшие свои гелеобразующие функции и состоящие из фрагментов гликопротеинов разного размера. Они представляют собой частицы из нескольких моносахаров, частично деградированных белков, частей молекул и их комплексов, которые находятся в растворенном состоянии. В слизистом слое определяются также все компоненты полости и подлежащего эпителия.

В табл. 6 представлены антирадикальная активность отмывок нативной слизи и состав внеструктурных компонентов пристеночного слизистого слоя соответствующих отделов желудочно-кишечного тракта. Было установлено, что во всех исследуемых отделах уровень антирадикальной активности отмывок слизи достоверно выше ($p < 0,05$), чем антирадикальная активность очищенных гликопротеинов (табл.5). Но достоверных отличий антирадикальной активности отмывок слизи между исследуемыми отделами желудочно-кишечного тракта (в направлении от желудка к толстому кишечнику) не обнаружено (табл.6).

Содержание N-ацетилнейраминовой кислоты и белка в отмывках слизи двенадцатиперстной кишки и тощей кишки достоверно выше ($p < 0,05$), чем в отмывках слизи желудка и толстого кишечника (табл. 6), как и при исследовании структурных компонентов (табл. 5). Однако взаимосвязи антирадикальной активности отмывок слизи с содержанием в них N-ацетилнейраминовой кислоты и белка не обнаружено. Также не обнаружено этой взаимосвязи с содержанием галактозы, фукозы, суммы моносахаров и ферментов (табл. 6).

Нашими исследованиями было показано, что уровень антирадикальной активности отмывок пристеночной слизи коррелирует (коэффициент корреляции равен 0,96) с содержанием в отмывках гексозаминов.

Более высокий уровень антирадикальной активности отмывок пристеночной слизи желудочно-кишечного тракта по сравнению с полимеризованными гликопротеинами можно объяснить присутствием в слизистом слое пищевых антиоксидантов и других компонентов, обладающих антиоксидантными свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны составы стандартных растворов и соотношение объемов проб для хемилюминесцентного метода сравнительных исследований антиоксидантной (источник радикалов - дифенилпикрилгидразил) и антирадикальной (источник радикалов - фитонцидная фракция) активности в различных биологических субстратах.
2. Установлено, что плазма крови и секреты пищеварительного тракта обладают способностью тушить люминозависимую хемилюминесценцию, индуцированную супероксид анионом и/или комплексом других радикалов.
3. Сравнительное исследование антиоксидантной и антирадикальной активности плазмы крови и слизи пищеварительного тракта показало, что антиоксидантная активность этих субстратов составляет от 1% до 2% их антирадикальной активности.
4. Добавление напитков, содержащих алкоголь, к пробам желудочной слизи или плазмы крови, изменяет исходную антиоксидантную и антирадикальную активность этих субстратов. Добавление коньяка снижает, а добавление алкогольных настоек

растительного сырья увеличивает исходную антиоксидантную и антирадикальную активность желудочной слизи или плазмы крови.

5. Установлены видовые различия уровня антиоксидантной и антирадикальной активности у человека, собак, мышей и цыплят-бройлеров. Наиболее высокие значения антиоксидантной активности установлены у мышей, антирадикальной активности - у собак.
6. Установлены возрастные изменения антиоксидантной и антирадикальной активности плазмы крови у бройлеров: наибольшая антиоксидантная активность установлена у половозрелых бройлеров, наибольшая антирадикальная активность установлена у бройлеров в пубертатном периоде.
7. Антирадикальная активность пристеночного слизистого слоя определяется полимеризованными гликопротеинами и внеструктурными компонентами слизистого слоя. Антирадикальная активность прямо коррелирует с концентрацией белка (0,85) и с концентрацией N-ацетилнейраминовой кислоты (0,78) в полимеризованных гликопротеинах. Антирадикальная активность внеструктурных компонентов пристеночного слизистого слоя выше, чем антирадикальная активность полимеризованных гликопротеинов. Уровень антирадикальной активности отмывок, получаемых при выделении полимеризованных гликопротеинов, имеет коэффициент корреляции, равный 0,96, с содержанием в отмывках свободных гексозаминов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кривова Н.А., Селиванова Т.И., **Заева О.Б.** Видовые особенности состава надэпителиального слизистого слоя пищеварительного тракта

- у крыс и мышей // Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1994. – Т.80, № 8. – С. 118-123.
2. Кривова Н.А., Медведев М.А., Селиванова Т.И., **Заева О.Б.** Состав гликопротеинов надэпителиального слизистого слоя пищеварительного тракта при введении пентагастрина и карбахолина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1994. – № 9. – С. 237-240.
 3. Кривова Н.А., Лаптева Т.А., Селиванова Т.И., **Заева О.Б.**, Ткаченко Е.В. Возрастные особенности состава надэпителиального слизистого слоя пищеварительного тракта у мышей // Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1995. – Т. 81, № 5. – С. 113-118.
 4. Кривова Н.А., Селиванова Т.И., Лаптева Т.А., **Заева О.Б.** Влияние внутрижелудочного введения простагландина E2 на секрецию слизи у собак // Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1995. – Т. 81, № 9. – С. 65-71.
 5. Кривова Н.А., Лаптева Т.А., Селиванова Т.И., **Заева О.Б.**, Ткаченко Е.В. Функциональное состояние надэпителиального слизистого слоя кишечника у мышей в постнатальный период после облучения // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1997. – Т. 37, вып. 5. – С. 765-771.
 6. Кривова Н.А., **Заева О.Б.** Антирадикальная неферментативная активность пристеночного слизистого слоя пищеварительного тракта // Механизмы функционирования висцеральных систем. Тезисы докладов международной конференции, посвященной 75-летию со дня рождения А.М. Уголева. – Санкт-Петербург, 2001. – С.196.
 7. Krivova N.A., Kopylova T.N., Dambaev G.Z., **Zaeva O.B.**, Svetlichnyi V.A., Hitriheev V.E., Kuznezova R.T. New Mechanism of Protection of an organism from Free Radicals of an External Environmental //5 Korea-

- Russia International Symposium on Science and Technology. – Tomsk, 2001. – Vol. 2. - P. 106-108.
8. Кривова Н.А., **Заева О.Б.**, Копылова Т.Н., Светличный В.А. Антирадикальная неферментативная защитная функция пристеночного слизистого слоя пищеварительного тракта // Тезисы докладов 18 Съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. – Казань, 2001. – С. 364-365.
 9. Кривова Н.А., **Заева О.Б.**, Копылова Т.Н., Светличный В.А., Носенко К.А. Антирадикальная активность желудочной и бронхиальной слизи // Труды 4 Съезда физиологов Сибири. – Новосибирск, 2002. – С. 22-23.
 10. Krivova N.A., Kopylova T.N., **Zaeva O.B.**, Svetlichnyi V.A., Kuznezova R.T., Lapteva T.A., Selivanova T.I. Modified method investigation antioxidant activity in food and biological liquids // Proceedings the 7-th Korea-Russia International Symposium on Science and Technology. – Ulsan, Korea, 2003. – Vol. 5. – LB07. – P. 27-33.
 11. Кривова Н.А., Копылова Т.Н., **Заева О.Б.**, Светличный В.А. Исследование антиоксидантной активности в напитках и биологических субстратах // Ноосферные знания и технологии: сборник статей. – Томск: Изд-во ТГУ, 2004. – С. 27-34.
 12. Кривова Н.А., **Заева О.Б.**, Копылова Т.Н., Светличный В.А. Антиоксидантная защитная функция пищеварительного тракта // Научные труды 1 Съезда физиологов СНГ. – Сочи, Дагомыс, 19-23 сентября 2005. – Москва: Изд-во «Медицина-Здоровье», 2005. – Т. 1. – С. 95-96.