

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ)

На правах рукописи

СЕДЫХ АНАСТАСИЯ ВАЛЕРЬЕВНА

**ВЛИЯНИЕ ФУНГИЦИДА ТИРАМ НА ПОКАЗАТЕЛИ
АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И ПРИНЦИПЫ ИХ КОРРЕКЦИИ**

1.5.15 экология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Королев Владимир Анатольевич

Курск – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Глава 1.	
Обзор литературы	12
1.1. Тирам.....	12
1.1.1. Физико-химические свойства тирама.....	12
1.1.2. Токсикологические свойства тирама.....	13
1.1.3. Особенности применения фунгицида тирам.....	15
1.2. Система антиоксидантной защита организма.....	16
1.2.1. Ферментативное звено антиоксидантной системы защиты.....	17
1.2.1.1. Супероксиддисмутаза.....	21
1.2.1.2. Каталаза.....	25
1.2.1.3. Глутатионовое семейство.....	27
1.2.1.3.1. Восстановленный глутатион.....	27
1.2.1.3.2. Глутатион окисленный.....	30
1.2.1.3.3. Глутатионпероксидаза.....	31
1.2.1.3.4. Глутатионредуктаза.....	32
1.2.1.3.5. Глутатион трансфераза.....	33
1.2.1.4. ROS.....	34
1.2.1.5. Общая антиоксидантная активность.....	36
1.2.1.6. Перекисное окисление липидов.....	38
1.2.2. Неферментативное звено антиоксидантной системы защиты.....	44
1.2.2.1. Растительные антиоксиданты.....	45
1.2.2.1.1. Витамин Е.....	46
1.2.2.1.2. Расторопша.....	47
Глава 2.	
Материалы и методы исследования	52
2.1. Материалы исследования.....	52

2.2. Методы исследования.....	53
Глава 3.	
Результаты собственных исследований.....	61
3.1. Показатели антиоксидантной системы в условиях пестицидной интоксикации тирамом.	61
3.2. Показатели антиоксидантной системы в условиях пестицидной интоксикации и компенсаторных возможностей организма при переходе на стандартный пищевой рацион.....	67
3.3. Показатели антиоксидантной системы в условиях пестицидной интоксикации и коррекции витамином Е.....	71
3.4. Показатели антиоксидантной системы в условиях пестицидной интоксикации и коррекции расторопшей.....	75
3.5. Экологически сбалансированный рацион питания с включением растительной продукции, содержащей антиоксиданты.....	79
Заключение.....	84
Выводы.....	92
Практические рекомендации.....	94
Список сокращений.....	95
Список литературы.....	96

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Антропогенное воздействие на биосферу, в настоящее время, представляет собой глобальную экологическую проблему [5; 50; 91; 110; 186; 312]. Одним из важных антропогенных химических факторов являются пестициды, которые способны вызывать неблагоприятные изменения окружающей природной среды [49; 270; 271]. Применение ксенобиотиков, наряду со значительным экономическим эффектом, сопровождается загрязнением всех компонентов биосферы [17; 90; 153]. Через воздух, с пищей и водой, а также через кожу и слизистые оболочки пестициды могут проникать в организм человека и оказывать неблагоприятное действие [6; 11; 74; 269]. В агропромышленном комплексе Российской Федерации особое место принадлежит группе фунгицидов, которые используются в значительных объемах [8; 15]. Широкое распространение получил фунгицидный препарат тирам (тетраметилтиурамдисульфид, ТМДТ). Токсикант относится к классу дитиокарбаматов и применяется в качестве контактного протравителя семян в борьбе с корневыми гнилями (гельминтоспориозная и фузариозная), плесневением семян, аскохитозом и антракозом [7]. Следует отметить, что тирам обладает выраженным кумулятивным действием и токсичен для теплокровных животных и человека. Поступление длительное время малых доз пестицида с продуктами питания приводит к развитию хронического токсического окислительного стресса [66; 68; 93; 246; 311]. Одним из важных патогенетических факторов в данном аспекте выступает нарушение процессов перекисного окисления липидов, которые необратимо приводят к нарушению липидного обмена и подавлению антиоксидантной системы организма [70]. Негативное влияние свободнорадикальных процессов при интоксикации фунгицидами, ставит вопрос о целесообразности проведения профилактических и коррекционных мероприятий антиоксидантами препаратами [32]. Однако, несмотря на значительное число работ, посвященных изучению роли свободно-радикальных процессов в донозологических последствиях отравлений химическими

веществами вообще, и тирамом в частности, перечень растительных антиоксидантов, используемых для коррекции последствий интоксикаций, остается немногочисленным [63; 202; 248]. Растительные антиоксиданты позволяют противодействовать прооксидантным факторам, что приводит к купированию последствий окислительного стресса в организме. Их недостаток можно восполнить благодаря разработке сбалансированного рациона питания, что позволяет исключить применение синтетических антиоксидантов. Именно поэтому изучение ранних проявлений пестицидной интоксикации и поиск доступных методов биоиндикации их токсического эффекта является приоритетным направлением современной науки [9; 22; 94; 219].

Степень разработанности темы.

Настоящая работа посвящена оценке влияния фунгицидного препарата тирам на состояние антиоксидантной системы организма, а также разработке способов коррекции прооксидантно-антиоксидантного баланса с применением растительных антиоксидантов – витамина Е и расторопши.

При пероральном поступлении пестицида в результате метаболизма в тканях организма происходит образование токсичных продуктов (2-тиоксо-4-тиазолидинкарбоновой кислоты, диметилдитиокарбамоил глюкуронида, диметилдитиокарбамоилсульфеновой кислоты, метилдиметилдитиокарбамата и диметилдитиокарбамоилаланина), что влечет за собой развитие окислительного стресса [10; 14; 25; 219]. Часть обнаруженных метаболитов абсорбируется в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и, в дальнейшем, вовлекается в последующий процесс детоксикации ферментами печени. Существенный вклад в изучение проблемы влияния ксенобиотика на антиоксидантную систему внесли Nebbia et al. (1993) показав, что прямое воздействие тирама приводит к снижению активности глутатионтрансферазы, что нарушает связывание восстановленного глутатиона с активным веществом и способствует ингибированию АО-состояния клетки за счет уменьшения образования ингибирующих реактивных интермедиатов [243].

Рядом исследователей показана способность тирама инициировать выработку активных форм кислорода и индуцировать перекисное окисление липидов, белковых аддуктов в гепатоцитах, что в конечном итоге, приводило к развитию фиброза печени [256; 285].

В настоящее время, приводятся данные о способности высоких концентраций препарата значительно снижать активность антиоксидантных ферментов печени: супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, что, в свою очередь, вызывает снижение антиоксидантной способности организма [314]. Также, показано, что подавление экспрессии глутатионпероксидазы ингибирует каталитическую конверсию восстановленного глутатиона в глутатион дисульфид и элиминацию активных форм кислорода из организма [179].

Ряд исследований, подтверждает эффективность применения растительных средств антиоксидантного действия, позволяющих нормализовать окислительно-восстановительные процессы организма [77; 252].

Тем не менее, в проанализированных работах не использовалось естественное поступление пестицида со стандартным рационом питания, что исключает влияние физиологического стресса на организм экспериментальных животных при пероральном поступлении препарата, а также не проводилась комплексная оценка влияния тирама на систему антиоксидантной защиты и антиоксидантной терапии растительными препаратами в биологических средах организма. Это обуславливает актуальность настоящей работы

Цель исследования: изучение влияния фунгицида тирам на вариабельность отдельных показателей антиоксидантной защиты организма и процессов перекисного окисления липидов, а также способы коррекции антиоксидантного статуса препаратами витамина Е и расторопшей.

Задачи исследования:

1. Выявить влияние пестицидной интоксикации на состояние антиоксидантной системы организма в плазме, эритроцитах крови и гомогенате печени.

2. Оценить интенсивность процессов перекисного окисления липидов по содержанию малонового диальдегида и диеновых конъюгатов при интоксикации тирамом в плазме и эритроцитах крови, а также гомогенате печени.

3. Разработать методы коррекции антиоксидантного статуса при пестицидных нагрузках с использованием антиоксидантных препаратов – витамина Е и расторопши.

Научная новизна.

1. Впервые разработана и применена модель естественного поступления пестицида с пищей в организм, позволяющая исключить физиологический стресс.

2. Впервые выявлены закономерности функционирования антиоксидантной системы и проведена оценка активности процессов перекисного окисления липидов при субхронической интоксикации фунгицидом тирам в плазме, эритроцитах крови, а также в гомогенате печени.

3. Впервые разработаны методы коррекции нарушений антиоксидантного статуса и процессов перекисного окисления липидов с применением растительных антиоксидантов – витамина Е и расторопши.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений о механизмах формирования донозологических нарушений в условиях окислительного стресса под действием субхронической интоксикации фунгицидным препаратом тирам. Разработаны рекомендации по сбалансированному питанию для работников предприятий агропромышленного комплекса, которые применимы при лечении и профилактике отравлений ксенобиотиками в профессиональной патологии.

Методология и методы исследования. Эксперименты были проведены на 80 крысах – половозрелых самцах линии Вистар возрастом 2 месяца с массой тела 200 – 220 граммов, которые содержались в индивидуальных клетках в условиях вивария в осенне-зимний период и в качестве стандартного пищевого рациона получали комбикорм полнорационный для лабораторных животных «Комбикормовая провинция» (ГОСТ 34566-2019). Для решения поставленных задач крысы были разделены на 8 групп по 10 животных в каждой группе. Первая

группа – здоровые, интактные крысы, которые являлись биологическим контролем. Во второй-пятой группах моделировалась субхроническая интоксикация. Животные получали пестицид тирам вместе с гранулированным кормом 1 раз в день утром в дозе $1/50 LD_{50}$ на протяжении 4-х недель. Расчет дозы препарата тирам выполнялся исходя из токсикологических данных: LD_{50} для крыс составляет 400 мг/кг [14]. В связи с тем, что в эксперименте использовались дозы $1/50 LD_{50}$, то после расчета доза для экспериментальных крыс-самцов линии Вистар массой 200 грамм составила: $400 \text{ мг/кг} * 0,02 \text{ кг} / 50 = 8 \text{ мг/кг}$ [124]. При этом гранулы корма измельчали, после чего добавляли взвешенную дозу пестицида, перемешивали, добавляли 2 мл дистиллированной воды и сформированные гранулы высушивали на воздухе в течение 12 часов. Данный способ поступления в организм имеет ряд преимуществ в отличие от внутрижелудочного введения, а именно служит моделью естественного поступления пестицида с пищей в организм и таким образом исключается физиологический стресс, который может повлиять на результаты эксперимента. Забор крови и печени производился через равномерные промежутки времени: на 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки, соответственно, для оценки динамики негативных последствий интоксикации тирамом и компенсаторных механизмов антиоксидантной защиты. Животные шестой группы получали пестицид тирам вместе с пищей 1 раз в день в дозе $1/50 LD_{50}$ на протяжении 28 дней, после чего животные были переведены на 30 суток на стандартный пищевой рацион. Данная группа была создана для оценки компенсаторных возможностей организма после интоксикации без фармакологической коррекции. В седьмой группе моделировалась субхроническая интоксикация на протяжении 28 суток, с последующим применением антиоксиданта – витамина Е в течение 30 суток. В группе восемь проводилась субхроническая интоксикация в течение 28 суток, с последующим использованием антиоксиданта – расторопши, на протяжении 30 суток. В 7 и 8 группах антиоксиданты вводили вместе с гранулированным кормом, при этом алгоритм формирования гранул аналогичен формированию гранул с пестицидом. Для исследования отбирали: плазму крови, эритроцитарную

массу и гомогенат печени экспериментального животного. Забой животных осуществляли под эфирным наркозом.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В условиях субхронической пестицидной интоксикации тирамом установлен дисбаланс процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты организма.

2. При переходе на стандартный пищевой рацион не зарегистрировано восстановление изучаемых показателей прооксидантно-антиоксидантного баланса за исключением малонового диальдегида в эритроцитарной массе крови.

3. При проведении коррекции витамином Е и расторопшей нарушений, вызванных действием ксенобиотика, установлено восстановление показателей системы антиоксидантной защиты и снижение содержания продуктов перекисного окисления липидов до уровня контрольных значений.

Степень достоверности и апробация работы. Диссертационная работа выполнена на лабораторной базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» министерства здравоохранения Российской Федерации, оснащенной современным оборудованием, необходимым для выполнения поставленных задач. Исследование проведено с использованием 80 лабораторных крыс-самцов, разделенных на 8 групп. Это позволило сформировать репрезентативные по размеру выборки для проведения качественного статистического анализа с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 13.0» (Stat Soft, USA).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» министерства здравоохранения Российской Федерации.

Основные результаты выполненной диссертационной работы доложены и обсуждены на научно-практических конференциях Всероссийского и Международного уровней: Международной научной конференции «Университетская наука: взгляд в будущее», посвященной 85-летию Курского

государственного медицинского университета, г. Курск, 7 февраля 2020 г.; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Рациональное природопользование – основа устойчивого развития» г. Грозный – Махачкала, 22 сентября 2020 г.; 85 Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Молодежная наука и современность» г. Курск, 23-24 апреля 2021 г.; XII Национальной научно-практической конференции (с международным участием) «Экологические чтения – 2021» г. Омск, 4-5 июня 2021 г.; V Международной научно-практической конференции «Новые научные исследования» г. Пенза, 23 октября 2021 г.; LVIII Международной научно-практической конференции «World science: problems and innovations» г. Пенза, 30 октября 2021 г.; XXVII Международной научно-практической конференции «European scientific conference» г. Пенза, 7 ноября 2021 г.; II International Online Conference for students and young scientists dedicated to the 30th Anniversary of the Independence of the Republic of Kazakhstan «From Experience To Project», 10-11 декабря 2021 г.; Международной научной конференции, посвященной 87-летию Курского государственного медицинского университета «Университетская наука: взгляд в будущее» г. Курск, 4 февраля 2022 г.; XVI Международной научно-практической конференции молодых ученых-медиков «Сова – 2022» г. Воронеж, 25 марта 2022 г.; 87 Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Молодежная наука и современность» г. Курск, 20-21 апреля 2022 г.

Внедрение результатов исследования. Основные фундаментальные положения, сформулированные в диссертационном исследовании, внедрены в учебный процесс кафедры биологии, медицинской генетики и экологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» министерства здравоохранения Российской Федерации.

Публикации. Всего по материалам диссертационной работы опубликовано 17 научных работ, из которых 4 – в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки

России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, и изданиях, приравненных к ним.

Личный вклад автора в исследование. Диссертантом лично сформулирована проблема, цель и задачи исследования, определен дизайн и методы исследования, проверка и группировка данных, осуществлена статистическая обработка и анализ полученных результатов. Проведен анализ литературных данных и сопоставление их с собственными результатами, сформулированы основные положения диссертационного исследования, выносимые на защиту, выводы, подготовлена диссертация. Личный вклад автора более 85%.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста и состоит из введения, глав, заключения и списка литературы, иллюстрирована таблицами. Список литературы содержит 321 источника, из которых 164 отечественных и 157 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Тирам

1.1.1. Физико-химические свойства тирама

Тирам (тетраметилтиурамдисульфид) – действующее вещество пестицидов, относящееся к классу дитиокарбаматы. Используется в агропромышленном комплексе (в том числе, в смеси с другими действующими веществами) для борьбы с грибковыми заболеваниями растений [234].

Тирам представляет собой кристаллическое вещество белого (желтовато-серого) цвета, не имеющее запаха. Не растворим в воде, но хорошо растворяется в хлороформе, ацетоне, хуже в спирте и эфире. Химически стойкое не летучее соединение (разлагается до нетоксичных компонентов в биологических средах в течение 0,2-2 лет), которое не разрушается в щелочной и кислой средах. Тирам разрушается сильными окислителями с образованием серной кислоты и углекислого газа; в щелочной среде восстановители переводят тетраметилтиурамдисульфид в соли диметилдитиокарбаминовой кислоты [14; 149].

Устойчив к воздействию высоких температур. После кипячения в воде (рН=5) в течение получаса в сосуде с обратным холодильником сохраняется 40% препарата. В щелочной среде (рН=7) после 2–4 часового кипячения сохраняется 30–60% внесенного тирама [140].

Тирам получают окислением щелочных солей диметилдитиокарбаминовой кислоты пероксидом водорода или нитритом натрия в кислой среде [141]. Также описано получение тирама на основе конденсации диметиламина с сероуглеродом в присутствии NaOH. На первой стадии получается натриевая соль N,N-диметилдитиокарбаминовой кислоты, которую затем димеризуют под действием кислорода, пероксида водорода или хлора (рисунок 1.1) [139].

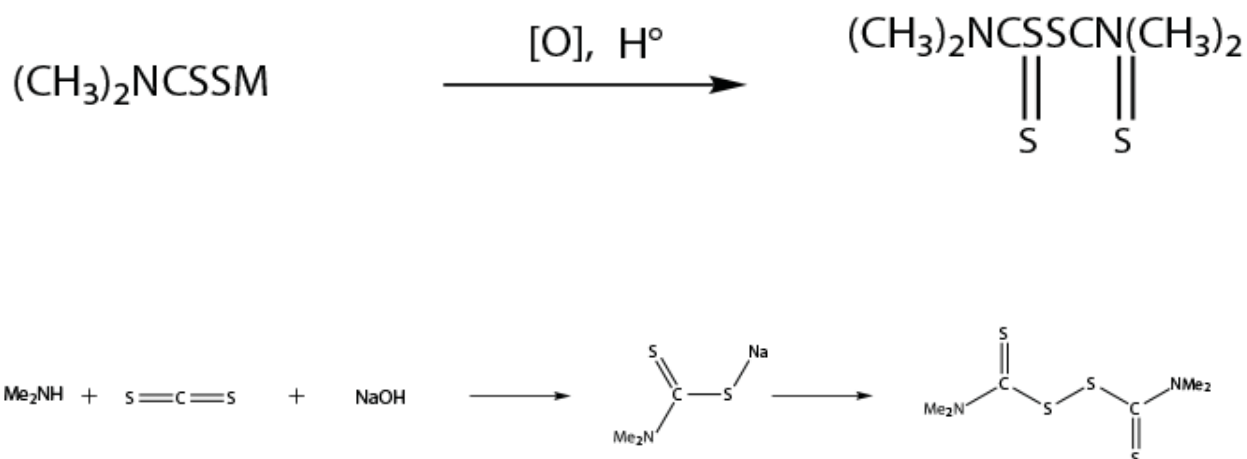


Рисунок 1.1 – Способы получения тирама

1.1.2. Токсикологические свойства тирама

В растениях и почве разлагается до более токсичных и более опасных метаболитов: тетраметилмоносульфида и тетраметилтиомочевины [13; 313]. Зерно, протравленное тирамом, нельзя скармливать животным, так как пестицид способен сохранять фунгицидную активность до 30 дней [150]. Среднетоксичен для теплокровных животных и человека [14]. В организме человека и млекопитающих разлагается до токсичных соединений: диметилдитиокарбамата и сероуглерода, и вызывает окислительные эффекты из-за наличия дисульфидного мостика в молекуле, и угнетающие эффекты за счет функции SH-диметилдитиокарбамат-аниона [205; 275].

LD₅₀ для крыс составляет 400 мг/кг при пероральном методе введения. Концентрированные водные растворы оказывают раздражающее воздействие на слизистые оболочки, поэтому следует избегать попадания препарата на кожу [141]. Обладает выраженным кумулятивным действием [196]. В больших дозах препарат оказывает мутагенное и канцерогенное действие, проявляет репродуктивную токсичность (таблица 1.1) [54; 316]. При этом важно отметить, что предельно допустимые концентрации или уровни тирама – это

максимальные концентрации пестицида в продуктах питания или окружающей среде, которые в течение неограниченно продолжительного времени (при ежедневном воздействии) не вызывают заболеваний или отклонений в состоянии здоровья, однако при накоплении токсиканта вводится понятие средней летальной дозы, показывающее среднюю дозу вещества, которая вызывает гибель половины членов испытываемой группы [11; 34; 91; 99; 190].

Таблица 1.1 – Токсикологические характеристики тирама

Средняя летальная доза (LD ₅₀) для крыс (мг/кг)	400
Допустимая суточная доза (ДСД) (мг/кг массы тела человека)	0,002
Ориентировочно допустимая концентрация (ОДК) в почве (мг/кг)	0,06
Предельно допустимая концентрация (ПДК) в воде водоемов (мг/дм ³)	0,01 (санитарно-токсикологический показатель)
Предельно допустимая концентрация (ПДК) в воздухе рабочей зоны (мг/м ³)	0,5
Предельно допустимая концентрация (ПДК) в атмосферном воздухе (мг/м ³)	0,05 (максимально разовая концентрация)
Максимально допустимый уровень (МДУ) в продукции (мг/кг):	
в горохе	0,1
в зерне хлебных злаков	0,01
в картофеле	0,005
в кукурузе (зерно, масло)	0,1
в плодовых (косточковые)	3,0
в плодовых (семечковые)	5,0
в просе	0,1
Временный максимально допустимый уровень (ВМДУ) в продукции (мг/кг):	
во всех пищевых продуктах	0,01

Вещество обладает репеллентными свойствами для грызунов и некоторых млекопитающих [41; 315].

Тирам при проникновении в организм человека ингибирует активность алкогольдегидрогеназы крови и повышает чувствительность к алкоголю. При употреблении этанола тяжелое отравление развивается уже при дозе тирама, равной 26 мг/кг [40; 149; 287]. Является липотропным ядом. При интоксикации организма поражает нервную систему, печень, желудочно-кишечный тракт, кроветворные органы, вызывает гиперплазию щитовидной железы [140; 233]. Как и большинство препаратов дитиокарбаминовой кислоты, тирам способен оказывать сенсibiliзирующее действие [314]. Описано поражение кожи у людей, носивших резиновые изделия (обувь, перчатки и др.), с сенсibiliзацией к тираму [59; 164].

Препараты на основе тирама относятся к III классу опасности для человека. К ним относят: ТМТД, ТМТД-плюс, Батыр, Актамыр, Фенорам супер, Старт, Тир, Витарос, Витавакс 200, Витавакс 200 ФФ, Витасил, Раксил Т, Витал [38; 44].

1.1.3. Особенности применения фунгицида тирам

Тирам применяется во многих Европейских странах (Бельгии, Болгарии, Чехии, Финляндии, Франции, Литве и др.) [43; 165].

Тирам используется в качестве контактного протравителя семян в борьбе с корневыми гнилями (гельминтоспориозная и фузариозная), плесневением семян, аскохитозом и антракозом. Не фитотоксичен [39; 41].

Ранее тирам использовали для борьбы с почвенными грибами - возбудителями корневых гнилей растений [150]. Но из-за неблагоприятных токсикологических свойств препарата, а также его значительной сохранности в воде ($DT_{50} = 46,7$ дней при $pH = 7,0$) препараты на его основе в России применяются только для обработки семян и семенного материала с целью их защиты от возбудителей плесневения и корневых гнилей, включая фузариозные, а также от корневых болезней, первичная инфекция которых сохраняется на

семенах. Длительная сохранность тирама в кислых и нейтральных почвах обеспечивает защиту высеянных сеянцев от почвенной инфекции на достаточно долгое время (1-1,5 месяца) [113].

Тирам применяется против болезней яровой и озимой пшеницы (плесневение семян, гельминтоспориозная и фузариозная корневые гнили, твердая головня); кукурузы (плесневение семян, бактериоз, фузариоз, пузырьчатая головня, корневые и стеблевые гнили); подсолнечника (белая и серая гнили, пероноспороз, плесневение семян); льна-долгунца (антракоз, полиспороз, фузариоз, аскохитоз, плесневение семян); свеклы сахарной, кормовой, столовой (корнеед всходов, пероноспороз, фомоз, церкоспороз, плесневение семян) и др.. Тирам совместим со многими препаратами, используемыми для обработки семян – триадименолом, карбоксином, тебуконазолом [320]. Можно применять с фосфо-азото- и нитробактерином, так как препарат не подавляет рост клубеньковых бактерий на корнях, а также активность бактериальных удобрений [14].

Также тирам используется в качестве источника серы и вторичного ускорителя серной вулканизации каучуков [43].

1.2. Система антиоксидантной защиты организма

Система антиоксидантной защиты представляет собой многокомпонентную систему организма, включающую в себя несколько «уровней обороны» и комплекс природных соединений (витамины, ферменты и низкомолекулярные соединения) и ферментативных систем, которые позволяют «очищать организм» от свободных радикалов, предотвращая их негативное воздействие на организм [16; 53; 135]. Антиоксидантная система является регулятором уровня процесса окисления липидов в живых организмах [87; 232]. Антиоксидантная система организма человека является естественным механизмом борьбы с избытком свободных радикалов [95; 114; 257]. Антиоксидантная система постоянно противостоит «губительному эффекту» свободных радикалов, которые непрерывно образуются в организме человека [3; 55; 227].

Физиологическую антиоксидантную систему организма по Воскресенскому О.Н. и Ткаченко Е.К. можно представить в виде следующей схемы (рисунок 1.2) [35]:

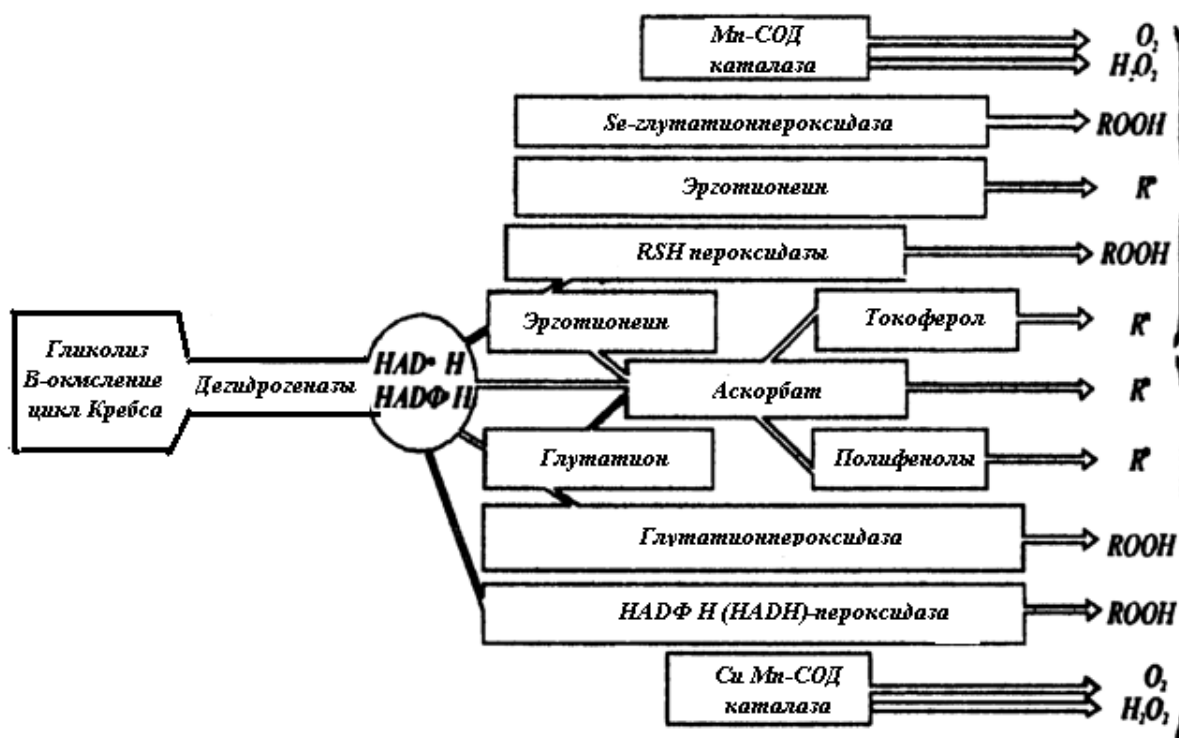


Рисунок 1.2 – Строение антиоксидантной системы

1.2.1. Ферментативное звено антиоксидантной системы защиты

На всех уровнях организации организма осуществляется защита от повреждающего действия свободных радикалов (СР) и активных форм кислорода (АФК) за счет функционирования системы антиоксидантной защиты (АОС) [31; 89; 160; 228; 244]. Благодаря работе АОС свободные радикалы нейтрализуются и не представляют опасности для функционирования организма [58; 272; 297].

Существует система биотрансформации токсикантов в организме [127]:

1. Фаза модификации

2. Фаза конъюгации

Биотрансформация токсикантов - это сложный многостадийный процесс, приводящий к потере токсичности, включающий две фазы [90]. Первая фаза – модификация молекулы токсиканта, в результате чего образуются или освобождаются функциональные группы (-ОН, -NH₂, -SH) и вещество становится полярным. Вторая фаза – конъюгация - синтетические реакции токсикантов с эндогенными веществами с образованием конъюгатов, которые выводятся из организма. Если в молекуле токсиканта имеются свободные функциональные группы, то биотрансформация может начаться со второй фазы. Реакции биотрансформации катализируют десятки ферментов, однако основная роль принадлежит изоферментам цитохрома P450. Многие реакции биотрансформации являются НАД и НАДФ-зависимыми [272].

Ведущее место среди ферментов 1-й фазы принадлежит системе цитохрома P450 (P450 или CYP) с точки зрения каталитической активности в отношении огромного числа ксенобиотиков. Локализована она в основном в мембранах эндоплазматической сети, также ее часто называют монооксигеназной системой или микросомальной системой метаболизма. Основные функции – образование в молекуле функциональных гидрофильных групп с детоксикацией десятков тысяч веществ [303]. Достоинствами системы являются локализация и высокая мощность на главных путях поступления ксенобиотиков в организм дыхательном (легкие) и пищевом (ЖКТ и печень), а также многообразие путей метаболизма: гидроксилирование, эпоксилирование, окисление по сере и азоту, восстановление нитро- и азогрупп, деалкилирование по азоту, кислороду и сере и десульфурация [45; 128; 293].

Основная функция второй фазы – присоединение к эндотоксину обезвреживающих элементов. Она включает в себя реакции глюкуронидации, ацетилирования, сульфатирования, метилирования, конъюгации с глутатионом (синтез меркаптуровой кислоты) и конъюгация с аминокислотами (таурин, глицин, глутаминовая кислота) [209]. Большинство ферментов 2-й фазы локализовано в цитозол. Функционирование второй фазы ограничивается тем, что

в ней участвуют только те вещества, которые уже прошли первую фазу метаболизма ксенобиотиков. Но с другой стороны эта фаза имеет важное достоинство – ферменты ответственные за присоединение нейтрализующих молекул есть во всех клетках [105; 136]. Поэтому во второй фазе уже вся совокупность клеток организма борется с токсинами, что позволяет эффективно осуществлять или завершать детоксикацию [130; 154].

Главным звеном системы АОЗ являются ферменты-антиоксиданты [98]. Эти соединения способны снижать и тормозить интенсивность свободнорадикальных процессов [120]. Ферменты-антиоксиданты могут находиться как внутри клеток (в цитоплазме и митохондриях, где образуется большинство внутриклеточных СР), так и экстраклеточно (рисунок 1.3) [27; 101; 192; 193].

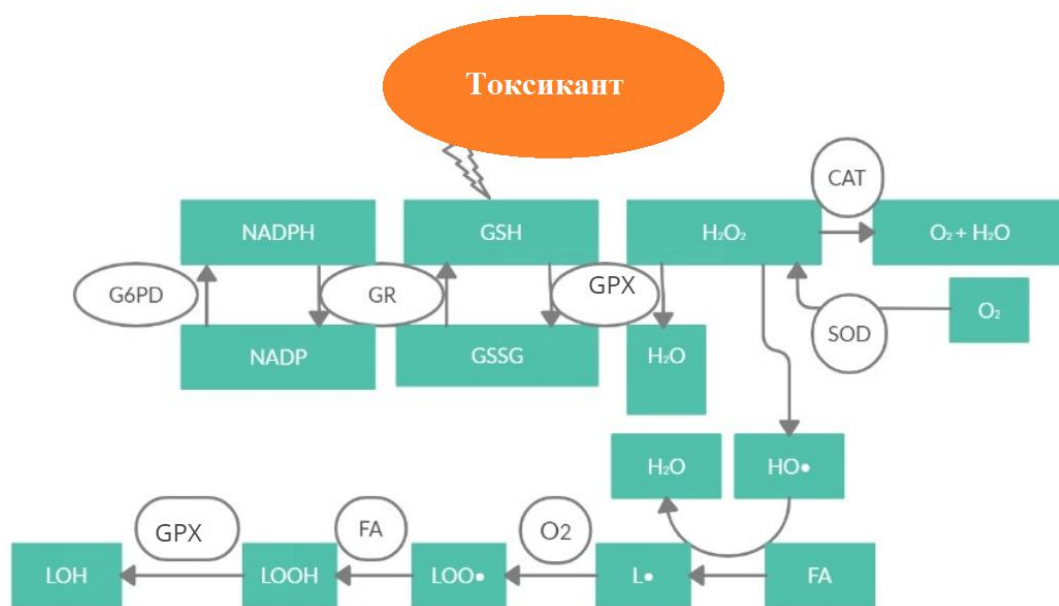


Рисунок 1.3 – Система антиоксидантной защиты организма

Таким образом, условно можно различить три уровня инактивации СР: превентивные антиоксиданты (церулоплазмин, металлотинин, альбумин, трансферрин, ферритин, миоглобин); инактивирующие антиоксиданты (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, каталаза и малые молекулы, такие как аскорбат, токоферол, билирубин, мочевая кислота, каратиноиды и флавоноиды) и репарирующие ферменты, восстанавливающие

разрушенные биомолекулы, такие как ДНК-репарирующие ферменты [79; 129; 137; 181].

Наибольший вклад в поддержание прооксидантно-антиоксидантного баланса вносят такие ферменты как: супероксиддисмутаза, каталаза и ферменты системы глутатиона [133; 182; 255; 256; 281].

В живых организмах механизмы детоксикации очень многообразны [142]. Но все они преследуют две основных цели: обезвреживание отравляющих соединений и их элиминация, в результате чего сохраняется постоянство внутренней среды и создается возможность для дальнейшего нормального протекания процессов жизнедеятельности организма [145]. В процессе метаболизма ксенобиотиков принимают участие около 30 ферментов. Принято различать две фазы: 1) модификация, создающая или освобождающая функциональные группы и 2) конъюгация – присоединение к последним других групп или молекул. Как правило, обе фазы метаболизма при совместном действии приводят к увеличению гидрофильности и снижению токсичности и активности молекулы. Можно также условно выделить третью фазу – «судьба ксенобиотиков», на которой происходит связывание и выведение ксенобиотиков и их метаболитов из клетки, а затем из организма [133].

К основным функциям антиоксидантной системы можно отнести [146]:

1. Защиту биомембран, вне- и внутриклеточных структур молекул чувствительных к окислительным воздействиям;
2. Ограничение интенсивности реакции перекисного окисления липидов;
3. Восстановление окислительных молекулярных повреждений.

Главной задачей антиоксидантной системы на организменном уровне является ограничение и предотвращение развития патологических состояний, возникающих в результате окислительно-восстановительных повреждений структур организма [256].

На антиоксидантную защиту организма значительное влияние оказывают экологические факторы [102]. Литературные данные позволяют судить, что

существует замкнутый контур регуляции интенсивности свободных радикальных процессов системой природных антиоксидантов по принципу отрицательной обратной связи [180]. Известно негативное влияние ксенобиотиков, тяжелых металлов, ионизирующего излучения на антиоксидантную систему, заключающееся в подавлении активности основных ее ферментов [132].

1.2.1.1. Супероксиддисмутаза

Организмы различной степени сложности, утилизирующие кислород в процессах обмена веществ, содержат фермент, обладающий способностью дисмутировать супероксидные радикалы, обрывая тем самым опасную цепь свободнорадикальных превращений [195]. Этот фермент называется супероксиддисмутазой (КФ 1.15.1.1., супероксид: супероксид оксидоредуктаза, СОД). СОД является, в основном внутриклеточным ферментом и лишь небольшая часть СОД обнаружена во внеклеточных жидкостях млекопитающих [239].

Существует несколько форм супероксиддисмутазы в зависимости от типа переходного металла-кофактора активного центра фермента: Cu-, Zn-СОД (медь как кофактор активного центра и цинк как кофактор, стабилизирующий конформацию), Mn-СОД (с марганцем в активном центре), а также менее распространённые Fe-СОД (с железом) и Ni-СОД (с никелем) [218].

Цитозоль практически всех эукариотических клеток содержит супероксиддисмутазу типа Cu-, Zn-СОД. Это самая распространённая супероксиддисмутаза и единственная коммерчески доступная для научных исследований форма фермента (как правило, выделенная либо из эритроцитов, либо из печени быка). Cu-, Zn-СОД является гомодимером (то есть состоящим из двух одинаковых субъединиц) с молекулярной массой 32,5 кДа [187]. Субъединицы белка связаны друг с другом в первую очередь гидрофобными и электростатическими связями. Медь и цинк связаны с белковой частью молекулы через гистидиновые остатки. Ионы цинка прямо не участвуют в реакции

дисмутации и выполняют структурную роль, обеспечивая конформацию белка, необходимую для работы активного центра фермента. Одновалентные анионы (хлора, гидроксила) являются конкурентными ингибиторами фермента, связывая ионы меди активного центра. Фермент ингибируется цианидом. Инактивация СОД перекисью водорода сопровождается люминесценцией и восстановлением цитохрома с [321].

Однако при низких концентрациях перекись водорода действует как восстановитель фермента. Восстановленный фермент довольно устойчив к кислороду. Обнаружено, что митохондриальная Cu-, Zn-СОД печени цыплят отличается от цитоплазматического фермента эукариот, имея свойства, близкие к марганец-СОД прокариот [50].

Аминокислотный состав фермента, спектр в видимой и ультрафиолетовой области схож с другими митохондриальными марганец-содержащими супероксиддисмутазами [44]. Марганец-СОД и железо-СОД прокариот не ингибируются цианидом [46], причем уровень второго фермента не зависит от присутствия кислорода и чувствителен к количеству ионов железа в питательной среде [47]. Различная локализация марганец-СОД и железо-СОД в *Escherichia coli*, по мнению Фридович И.В. [28], дает основание полагать, что оба фермента играют неодинаковую роль в защите от супероксидных радикалов: марганец-СОД, содержащаяся в матриксе прокариот, защищает от эндогенных, а железо-СОД периплазматического пространства функционирует, как «ловушка» экзогенных супероксидных анион-радикалов [179].

Митохондрии эукариотических клеток и многие бактерии содержат супероксиддисмутазу с Mn (Mn-СОД). Например, митохондриальная СОД человека (ЕС 1.15.1.1) с молекулярной массой 86-88 кДа [181].

E. coli и многие другие бактерии содержат формы фермента с железом (Fe-СОД), другие - с марганцем (Mn-СОД), а некоторые – оба эти типа. (*E. coli* Fe-SOD: ЕС 1.15.1.1). Активные центры Mn- и Fe-СОД содержат те же аминокислоты в боковых цепях [188; 217].

В организме человека существует три типа СОД. СОД1 находится в цитоплазме, СОД2 – в митохондриях, а СОД3 – это внеклеточная (экстраклеточная) форма. Первая форма - димерная, тогда как вторая и третья формы - тетрамерные (состоящие из 4 равных субъединиц) [230]. СОД1 и СОД3 содержат медь в активном центре и цинк как структурный компонент, а СОД2 содержит марганец в активном центре. Гены этих форм локализируются соответственно в хромосомах 21, 6 и 4 (21q22.1, 6q25.3 и 4p15.3-p15.1). Цитозольная СОД1 является небольшим белком с молекулярной массой 32,5 кДа, молекулярная масса митохондриальной СОД2 – около 86-88 кДа. Экстраклеточная СОД3 представляет собой самую крупную супероксиддисмутазу, молекулярная масса - 135 кДа [206].

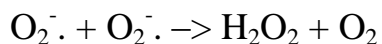
У мышей активность Cu-, Zn-СОД снижается в ряду: печень, поджелудочная железа, почки, эритроциты, сердце, мозг, мышечная и жировая ткань. По мере убывания активности Mn-СОД исследуемые органы и ткани располагают в следующем порядке: сердце, почки, печень, мозг, поджелудочная железа, мышечная, жировая ткань, а в эритроцитах – фермент отсутствует [104].

Механизм функционирования СОД включает последовательное восстановление и окисление ионов металла переменной валентности в активном центре фермента. Фермент относится к группе антиоксидантов-катализаторов прямого действия [234].

Позднее была обнаружена и выделена экстрацеллюлярная форма супероксиддисмутазы, которая представляет собой гликопротеид, состоящий из двух димеров, соединенных дисульфидным мостиком [48]. Каждая из 4-х субъединиц имеет молекулярную массу около 30 кДа [49], содержит ионы меди и цинка [231]. Все субъединицы фермента имеют одинаковую аминокислотную последовательность [57]. Субъединицы экстрацеллюлярной и цитоплазматической Cu-, Zn-СОД отличаются аминокислотным составом, антигенными свойствами, генным локусом, кодирующим аминокислотную последовательность апофермента и более низкой каталитической активностью [2]. Если Cu-, Zn-СОД – гомодимер, каждая субъединица которого имеет четыре остатка цистеина, то экстрацеллюлярная супероксиддисмутаза – тетрамер,

субъединицы которого содержат по шесть остатков цистеина. Экстрацеллюлярная СОД присутствует в основном во внеклеточных пространствах [166].

Супероксиддисмутазы (металлоферменты) катализируют реакцию:

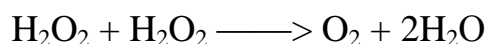


Скорость реакции чрезвычайно высока и лимитируется только скоростью диффузии O_2^- . Супероксиддисмутаза осуществляет инактивацию радикалов кислорода, которые могут возникнуть в ходе биологических реакций переноса электронов или при воздействии металлов с переменной валентностью, ионизирующего, ультрафиолетового излучения, ультразвука, гипербарической оксигенации, различных заболеваний [166].

С возрастом имеет место значительное снижение удельной активности цитоплазматической супероксиддисмутазы в печени крыс и мышей, небольшое уменьшение в сердце, а в мозге – без изменений. При этом отмечается падение каталитической активности фермента [104]. По другим данным, у мышей супероксидазная активность с возрастом повышается во всех отделах и структурах головного мозга, за исключением гиппокампа [106]; у крыс – не изменяется в предлобной (префронтальной) коре головного мозга, в хвостатом ядре, а в теменной (париетальной) области коры и в среднем мозге уменьшается [107]. Снижение супероксидазной активности в постмитохондриальной фракции мозга в отличие от митохондрий при старении связывают с ослаблением биосинтеза фермента и с характерными возрастными посттрансляционными изменениями, обусловленные окислительной модификацией полипептидной цепи белка [108]. Активация перекисного окисления липидов, рост количества пероксида водорода и снижение уровня глутатиона, сопровождаемое падением активности СОД, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в тестикулярных митохондриях крыс с возрастом, по мнению Sahoo D.K. и соавт. может свидетельствовать об ослаблении антиоксидантной системы и оказывать влияние на такие физиологические функции, как стероидогенез и сперматогенез [109].

1.2.1.2. Каталаза

Каталаза (КФ I.П.1.6, H_2O_2 : H_2O_2 - оксидоредуктаза, КТ), фермент участвующий в детоксикации нерадикальной активной формы кислорода - H_2O_2 . Почти во всех животных клетках и органах определяется каталазная активность. Особенно богаты каталазой клетки печени, почек, эритроциты. Она предотвращает накопление в клетке перекиси водорода, образуемой при аэробном окислении восстановленных флавопротеидов и из O_2 - [51]:



По химическому составу является гемопротеином и состоит из 4-х идентичных субъединиц, каждая из которых в качестве простетической группы содержит гем с трёхвалентным железом. Апобелки каталаз животного происхождения видоспецифичны. Гем в белковой глобуле каталазы находится в гидрофобном окружении [49; 116].

Считается, что вклад каталазы в процесс антиоксидантной защиты, позволяет нейтрофильным гранулоцитам активировать поглощение антигенов, что дает возможность снизить интенсивность воспаления [189]. Наличие обратной зависимости активности каталазы и содержания естественных киллеров обусловлено тем, что данный фермент может снизить активность естественных киллеров, а перекись водорода регуляторно повышает их активность. Показано, что при различных экологических условиях у больных хроническим неспецифическим бронхитом характер межсистемных взаимоотношений изменяется. При незначительном прессинге со стороны техногенного загрязнения ведущую роль играют факторы антиоксидантной защиты, в том числе активность каталазы. Наиболее неблагоприятные экологические условия вызывают нарушения в координации иммунометаболических процессов, приводящие к меньшей сбалансированности приспособительных реакций организма, одними из которых служит баланс системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности [62].

Реакция разложения пероксида водорода каталазой протекает в два этапа [207]. На первом этапе происходит взаимодействие фермента с первой молекулой H_2O_2 , которая связывается с Asn147 и His74. Затем протон транспортируется от одного атома кислорода к другому, что приводит к поляризации O-O связи и ее разрушению. В результате, железо геммовой группы связывается с атомом кислорода, а из активного центра уходит молекула воды. На втором этапе происходит взаимодействие со второй молекулой H_2O_2 , что ведет к образованию еще одной молекулы воды, молекулярного кислорода и регенерации гемма [277].

Данный фермент, как правило, находится в пероксисомах. В клетках растений пероксисомы участвуют в фотодыхании и симбиотической фиксации азота. Каталаза обнаружена у подавляющего большинства известных организмов практически в каждом органе, причем особенно высокие концентрации приходится на печень [190].

Каталаза может разложить 44 000 молекул H_2O_2 в секунду (относится к числу ферментов с наиболее высоким числом оборотов). Для расщепления большого количества перекиси водорода требуется малое количество фермента. Скорость реакции определяется диффузией и не требует энергии для активации. Каталаза преимущественно находится в пероксисомах, внеклеточно каталаза находится в незначительных концентрациях. Наибольшая активность каталазы в организме характерна для печени [230]. К алиментарным факторам, понижающим каталазную активность, относят недостаточность витаминов группы В, фолиевой кислоты, биотина, пантотеновой кислоты, рибофлавина, витамина А. Снижение активности каталазы наблюдается при избытке метионина, тирозина, цистина, меди, цинка. В эритроцитах при высокой скорости образования перекиси водорода (10^{10} - 10^9 моль H_2O_2 на 1 мг гемоглобина в 1 мин) преобладает активность глутатионпероксидазы, а при низкой скорости образования H_2O_2 (10^9 - 10^7) – защитное действие оказывает в основном каталаза [190; 277].

Активности каталазы и СОД коррелируют между собой, что может быть связано с переключением потока электронов с одной цепи транспорта на другую.

В этих условиях СОД и каталаза действуют как звенья одной системы утилизации кислорода, размещенные в разных участках клетки [166].

В клинической биохимии интоксикации организма (как эндогенной, так и экзогенной) актуален мониторинг активности каталазы как в цельной крови, так и в ее фракциях – плазме, эритроцитах. В экологии человека разработан метод оценки качества окружающей среды, базирующийся на оценке активности каталазы [190].

1.2.1.3. Глутатионовое семейство

1.2.1.3.1. Восстановленный глутатион

Глутатион (γ -глутамил-цистеинил-глицин, GSH) – одно из основных внутриклеточных низкомолекулярных тиолсодержащих соединений, синтезирующихся почти во всех эукариотических клетках [222]. Глутатион в восстановленной форме, может функционировать как антиоксидант многими способами: химически взаимодействовать с синглетным кислородом, супероксидом и радикалами гидроксила или на прямую разрушать свободные радикалы; стабилизировать мембранную структуру перемещением ацилпероксидов, образующихся путем перекисного окисления липидов (ПОЛ) [194]. GSH является коферментом ряда ферментов, активность которых основана на изменении редокс-потенциала глутатиона [307]. Недостаток GSH подвергает клетку риску окислительного повреждения [306; 308].

Примерно 85–90% GSH находится в цитозоле, но некоторая его часть после синтеза в цитозоле оказывается в митохондриях, ядре, пероксисомах, эндоплазматическом ретикулуме [61; 245]. Большая часть содержания GSH плазмы крови обеспечивается его синтезом в печени, поэтому сбой этого процесса в данном органе ведут к системным межорганным нарушениям гомеостаза глутатиона [258; 291].

Синтез GSH de novo проходит в два АТФ-зависимых этапа, которые включены в цикл шести ферментативных реакций, получивших название γ -глутамильного цикла [197]. Первый этап – реакция образования пептидной связи между цистеином и глутаминовой кислотой, которая катализируется γ -глутамилцистеинлигазой (γ -GCL) и является скоростью-лимитирующей реакцией в синтезе GSH. Второй этап – реакция, катализируемая глутатионсинтетазой (GS), приводящая к образованию GSH в результате связывания глицина с γ -глутамилцистеином. Фермент, способный гидролизовать специфическую связь в молекуле GSH между остатками глутаминовой кислоты и цистеина, – γ -глутамилтрансфераза (γ -GT), локализован на внешней стороне цитоплазматической мембраны определенных типов клеток и обеспечивает перенос γ -глутамильного остатка на аминокислоту, делая возможным ее транспорт в клетке. Образующийся в результате действия γ -GT дипептид цистеинилглицин расщепляется дипептидазой с образованием цистеина и глицина, которые становятся субстратами для γ -GCL и GS соответственно. γ -Глутамилциклотрансфераза обеспечивает разрыв связи γ -глутамильного остатка с аминокислотой с образованием свободной аминокислоты и 5-оксопролина, который под действием оксопролиназы дециклизуется, образуя глутаминовую кислоту, которая также становится субстратом для γ -GCL. Таким образом, внеклеточный глутатион может быть разрушен, входящие в его состав аминокислоты способны попасть внутрь клетки вновь, где опять возможно их включение в состав молекулы GSH. Большая часть содержания GSH плазмы крови обеспечивается его синтезом в печени, поэтому сбой этого процесса в данном органе ведут к системным межорганным нарушениям гомеостаза глутатиона. Восполнение содержания GSH осуществляется не только за счет синтеза de novo, но и активности глутатионредуктазы (GR), которая восстанавливает GSSG в присутствии НАДФН(H⁺) до GSH [244; 290].

Ключевым функциональным элементом в молекуле GSH является остаток цистеина, обеспечивающий наличие реакционноспособной тиольной группы. Среди функций, которые выполняет глутатион в клетке, в первую очередь надо

отметить его участие в защите клеток от продуктов окислительного стресса. Пероксид водорода восстанавливается до воды глутатионпероксидазой с использованием GSH в качестве косубстрата [199]. Глутатион необходим для поддержания реакций аскорбат-глутатионового цикла, связанного с нейтрализацией перекиси водорода. Окисленный глутатион (GSSG) – низкомолекулярный тиол, выявляемый во всех типах клеток и внеклеточном пространстве. Содержание GSSG в клетках и вне их невелико и жестко регулируется относительно сопряженного с ним соединения – восстановленного глутатиона (GSH), составляя 10^{-4} – 10^{-5} М против 10^{-2} – 10^{-1} М GSH [18]. Роль окисленного глутатиона в физиологических процессах рассматривается преимущественно в аспекте клеточных реакций глутатиона. В норме содержание GSSG в тканях и плазме крови млекопитающих поддерживается на уровнях, во много раз более низких, чем для GSH [36].

Глутатион обычно отсутствует у анаэробных микроорганизмов – прокариот и некоторых эукариот, но есть почти у всех аэробов, что свидетельствует в пользу гипотезы о появлении глутатиона у эукариота в связи с возникновением аэробного метаболизма и митохондрий. Уже это дает основание полагать, что глутатион защищает клетки от активных форм кислорода, образование которых – неизбежное следствие аэробной жизни. Само по себе появление свободных радикалов в живом организме – нормальный биологический процесс, и в норме количественные аспекты этого процесса строго регулируются. Кислород, являясь необходимым условием существования аэробных клеток, является и потенциальным постоянным источником возникновения кислородных свободных радикалов. При больших физических нагрузках количество O_2 может возрасти в 10 раз. Самопроизвольное аутоокисление в клетке, а также и в неклеточном веществе тормозится физиологической антиоксидантной системой (ФАС). Эта система включает биоантиоксиданты (БАО), ингибирующие перекисление на начальной стадии образования свободных радикалов липидов (токоферол) или активных форм кислорода (супероксиддисмутаза). Антирадикальное ингибирование осуществляется цепью: глутатион – аскорбат – токоферол,

транспортирующей электроны (в составе атомов водорода) от пиридиннуклеотидов (NAD-H и NADP-H) к свободным радикалам [200]. Таким образом, обеспечивается стационарный крайне низкий уровень свободнорадикальных состояний липидов и биополимеров в клетке. Ключевая роль в защите клетки от оксидативного стресса должна, по-видимому, отводиться системе глутатиона (рисунок 1.4) [199].



Рисунок 1.4 – Влияние глутатиона на редокс-регуляцию основных процессов жизнедеятельности клетки

1.2.1.3.2. Глутатион окисленный

Глутатион окисленный (дисульфид глутатиона, GSSG) является продуктом неферментативного окисления GSH [266]. Некоторая часть глутатиона присутствует в клетке в связанном виде в составе смешанных дисульфидов (GSSR) с самыми разнообразными внутриклеточными белками. Количество GSSG

не превышает 1% от его общего внутриклеточного содержания глутатиона. Под клеточным пулом глутатиона принято понимать совокупность его основных несвязанных с белками форм, GSH и GSSG. Их концентрации находятся в динамическом равновесии и меняются под действием разнообразных факторов, как внутренних, так и внешних. Соотношение GSH/GSSG – общепринятый маркер, отражающий состояние клетки, ее редокс-статус. Так, в норме GSH/GSSG составляет в среднем 100/1, но в результате окислительного стресса может уменьшаться вплоть до 1/1 [67]. GSH/GSSG является основной редокс-парой, определяющей способность клетки сопротивляться окислительному стрессу [243; 282].

1.2.1.3.3. Глутатионпероксидаза

Глутатионпероксидаза (GPx) является гемсодержащим ферментом, функцией которого является обезвреживание H_2O_2 [18]. GPx – это селензависимый фермент, поэтому ее активность напрямую зависит от содержания селена в крови [301]. Обладает большим сродством к пероксиду водорода, за счет чего эффективна даже при низких концентрациях. Особенностью GPx является наличие в активном центре фермента - селеноцистеина. В качестве восстановителя для H_2O_2 данный фермент использует трипептид глутатион, содержащий цистеин связанный с его SH-группой. Окисленный в результате данной реакции глутатион восстанавливается глутатионредуктазой [173].

GPx разлагает пероксиды до воды (или спирта), одновременно окисляя GSH. Классический цитозольный GPx использует восстановленный глутатион (GSH) исключительно в качестве восстанавливающего субстрата для восстановления перекиси водорода, а также ограниченное количество органических гидропероксидов, таких как гидропероксид кумола и гидропероксид третбутила. Примечательно, что глутатионпероксидаза конкурирует с каталазой за место субстрата для H_2O_2 и является основным источником защиты от низких уровней окислительного стресса. Их вклад в

разложение H_2O_2 варьирует в зависимости от количества и места образования перекиси водорода [172; 276].

Существует несколько селенсодержащих форм глутатионпероксидазы [118; 185; 213; 214; 289]:

Глутатионпероксидаза 1 (GPx1) - тетрамерная форма, является наиболее распространенной формой фермента, и обнаружена в цитоплазме практически всех тканей млекопитающих, субстратом GPx1 является как пероксид водорода, так и многие органические гидропероксиды.

Глутатионпероксидаза 2 (GPx2) - также тетрамерный фермент, экспрессируется в кишечнике. Наибольшие концентрации этого фермента найдены у основания крипт кишечника. В эмбриогенезе экспрессия гена, кодирующего GPx2, преобладает в быстрорастущих тканях.

Глутатионпероксидаза 3 (GPx3) является внеклеточным тетрамерным ферментом и в основном встречается в плазме. Секретируется в плазму крови в основном почками.

Глутатионпероксидаза 4 (GPx4) - мономерный изофермент, имеет большое значение в метаболизме гидропероксидов липидов. GPx4 также экспрессируется практически во всех клетках млекопитающих на более низких уровнях. Существует в виде трех форм, синтезирующихся с одного и того же гена (цитозольная, митохондриальная формы и GPx4 ядер клеток спермы).

Глутатионпероксидаза 5 (GPx5) - тетрамерная неселеновая GPx, специфичная для придатков семенников (образуется в эпителии головки придатка семенника).

Глутатионпероксидаза 6 (GPx6) - тетрамер, селенопротеин у человека и неселеновый фермент у грызунов, экспрессия гена этого фермента выявлена в эмбрионах мышей и в боуменовых железах под обонятельным эпителием.

1.2.1.3.4. Глутатионредуктаза

Глутатионредуктаза (GSR) состоит из 2 одинаковых субъединиц с молекулярной массой 50-55 кДа, полость между которыми в ходе реакции занимает окисленный глутатион. На одном конце каждой субъединицы расположен кофермент флавинадениндинуклеотид, на другом — НАДФН-связывающие участки [321].

GSR (КФ 1.8.1.7) — фермент, восстанавливающий дисульфидную связь окисленного глутатиона (GSSG) до его сульфгидрильной формы (GSH). Восстановление глутатиона происходит за счёт энергии НАДФ-Н, образующегося в пентозном пути. В таких клетках как эритроциты, которые постоянно подвержены высокому оксидативному стрессу, до 10% потребляемой глюкозы используется на восстановление глутатиона глутатионредуктазой [229].

Реакция восстановления дисульфида глутатиона катализируемая GSR [224]:



1.2.1.3.5. Глутатионтрансфераза

Значительная роль в клеточных редокс-зависимых процессах принадлежит глутатион S-трансферазе (КФ 2.5.1.18, GST), образующей суперсемейство изоформ, катализирующих конъюгацию глутатиона с широким рядом неполярных соединений эндогенного и экзогенного происхождения, содержащих электрофильные атомы углерода, серы, азота и фосфора, что вносит важный вклад в защиту клетки от возможного токсического действия этих соединений [71; 184]. К настоящему моменту изоферменты GST обнаружены в большинстве живых организмов, включая аэробные бактерии, дрожжи, растения, насекомых и позвоночных. В суперсемействе GST выделяют три субсемейства изоформ: цитозольные, митохондриальные и микросомальные [295]. У млекопитающих GST присутствует практически во всех органах и тканях, при этом содержание фермента в печени наибольшее. На долю цитозольных изоформ приходится примерно 90% активности GST в клетке [79; 231; 319].

Микросомальные изоформы GST – это интегральные мембранные белки, которые в настоящее время получили название «мембрансвязанных белков метаболизма эйкозаноидов и глутатиона» [195; 266]. Как и представители цитозольных изоформ GST микросомальные изоформы катализируют конъюгацию GSH с электрофильными соединениями [151; 231].

Митохондриальной изоформой GST человека является изоформа GSTK1-1, принадлежащая к к-классу [265]. Эта изоформа обнаружена и в пероксисомах человека [258].

К основным функциям GST наряду с важной ролью в системе детоксикации относится участие в работе антиоксидантной системы благодаря способности восстанавливать органические гидроперекиси до спиртов, используя GSH в качестве косубстрата [231; 300].

Реакция катализируемая GST [318]:



Существенной является роль GST в регуляции клеточного сигналинга за счет белок-белковых взаимодействий с киназами, которые активируются окислительным стрессом [234; 305].

1.2.1.4. ROS

В клетках аэробных организмов кислород используется главным образом в митохондриях, где при сопряжении окисления с фосфорилированием происходит синтез АТФ и образование тепла [260]. Наряду с окислительным фосфорилированием в организме постоянно протекают реакции неполного (одно-, двух и трехэлектронного) восстановления кислорода, в ходе которых и образуются его активные (радикальные) формы [188; 317]. К числу основных активных форм кислорода относят супероксиданион-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), гидроксильный радикал (OH^{\cdot}), перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) и др. [56; 57; 156; 317].

Активные формы кислорода включают в себя понятие ROS [279; 288]. Это показатель, объединяющий радикальные и нерадикальные производные активного кислорода [259]. К ним относится гидроксильный радикал, пероксинитрит, супероксид, хлорноватистая кислота, оксид азота, перекись водорода, синглетный кислород, азот и другие [291]. Эти соединения могут участвовать в цепной свободнорадикальной реакции или повреждать органические субстраты [167; 280].

Как в патологических, так и в физиологических условиях образование АФК происходит в нескольких биологических системах, таких как дыхательная цепь митохондрий, электронно-транспортная цепь микросом, при переходе оксигемоглобина в метгемоглобин, в процессах метаболизма арахидоновой кислоты, в реакции гипоксантин-ксантиноксидаза, при биосинтезе и окислении катехоламинов и др. [75; 147]. Образующиеся АФК участвуют в двух разнонаправленных, но постоянно протекающих биохимических процессах – катаболизме старых и синтезе новых молекул. С помощью АФК в клетке происходит окисление тех липидов и белков, которые должны быть подвержены деструкции [294]. Это облегчает дальнейшее действие ферментов деградации, поскольку они имеют на несколько порядков большее сродство именно к окисленному субстрату. Благодаря этому АФК включены в постоянно протекающие в клетке катаболические процессы [23; 126; 201].

С другой стороны, АФК участвуют также в постоянно протекающем синтезе новых молекул [261]. Так, с помощью свободнорадикального окисления полиненасыщенных жирно-кислотных остатков фосфолипидов, составляющих биологические мембраны, происходит синтез таких физиологически активных веществ липидной природы, как лейкотриены, тромбоксаны, простагландины [282]. Следовательно, участвуя в катаболизме и синтезе, АФК способствуют адаптации клетки к новым условиям среды, изменяя состав мембранных фосфолипидов и обновляя белковый спектр [19; 20; 286].

В концентрациях, превышающих физиологические, радикальные соединения являются высокотоксичными для биологических систем всех уровней,

от молекулярного до организменного. Являясь химически активными соединениями, свободные радикалы вступают в реакции с молекулами различной химической природы и вызывают деградацию структурных белков и липидов клеточных мембран и нуклеиновых кислот, ингибирование ферментов, изменение структуры и функциональных свойств гормонов и их рецепторов [156; 262].

Наряду с прямым повреждающим действием АФК на клеточные структуры и эндогенные макромолекулы не менее значимыми являются последующие процессы, индуцируемые радикалами кислорода [258; 277]. К их числу прежде всего относятся АФК-индуцированное увеличение уровня свободного кальция и изменение кальцийзависимых процессов [125; 126; 250]. Чрезмерное накопление АФК сопровождается разрушением многих компонентов антирадикальной защиты, особенно белковой природы, что ведет к дальнейшему повышению уровня свободнорадикальной реакции [216]. АФК, генерируемые внутриклеточно, а также проникающие внутрь через мембрану, являются пусковым фактором индукции апоптоза [122; 125; 263].

Одним из важнейших следствий повышенного образования АФК является избыточная и неконтролируемая в этих условиях активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Чрезмерная, патологически усиленная активация ПОЛ под действием АФК приводит к изменению или даже повреждению клеточных мембран, опасность которого для организма трудно переоценить. При чрезмерной активации ПОЛ, когда значительная часть мембранных фосфолипидов подвергается окислительной деградации, липидная фаза мембран становится более ригидной [283]. Это ограничивает конформационную подвижность полипептидной цепи, вследствие чего снижается функциональная активность ферментов, рецепторов и каналобразующих белков, встроенных в мембраны, что в свою очередь препятствует удалению ионов кальция из саркоплазмы и обеспечивает повреждающее действие кальция на клеточные органеллы [148; 278].

1.2.1.5. Общая антиоксидантная активность

В настоящее время для оценки функционального состояния антиоксидантной системы человека наряду с определением содержания отдельных антиоксидантов используют показатель, обозначаемый как общая антиоксидантная активность (ОАА) [273]. ОАА - это интегральный показатель, отражающий ее способность противодействовать развитию свободнорадикальных реакций в какой-либо модельной системе [3; 235; 274]. Основными компонентами таких модельных систем являются система генерации радикалов и субстрат (или молекула-мишень), который подвергается свободнорадикальному окислению [264; 284]. Инициирование образования радикалов в модельных системах может осуществляться различными способами, например, с помощью ионов металлов переменной валентности, УФ-облучения, азосоединений, ферментов, смеси метмиоглобина с H_2O_2 [73; 236]. В качестве субстрата окисления могут выступать гомогенаты тканей и органов, суспензии модельных и биологических мембран, эмульсии ненасыщенных жирных кислот, красители [3; 285]. Добавление в модельную систему плазмы крови, содержащей различные водо- и жирорастворимые антиоксиданты, приводит к уменьшению образования радикалов и торможению окисления субстрата, которое регистрируется с помощью различных методов: хемиллюминесценции (ХЛ), спектрофотометрии, флуориметрии, полярографии и т.д. [2; 21; 285]. Для количественной оценки величины ОАА плазмы крови ее выражают через концентрацию стандартного антиоксиданта [92]. В качестве стандартного антиоксиданта часто используется тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) – водорастворимый структурный аналог витамина Е или какой-либо другой антиоксидант [47; 251].

Существует много способов определения ОАА плазмы крови. Выделяют 2 наиболее распространенных подхода для определения ОАА плазмы крови. Первый метод основан на генерации водорастворимых пероксильных радикалов ($RO_2\cdot$). В качестве источника $RO_2\cdot$ обычно применяют водорастворимые

азосоединения, например, 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорид (АБАП). При добавлении АБАП в водную среду он подвергается термическому распаду с постоянной скоростью реакции. Возникающие в результате этого процесса радикалы взаимодействуют с кислородом, с образованием $RO_2\cdot$. Последние индуцируют окисление люминола, которое сопровождается ХЛ. В присутствии плазмы крови наблюдается ингибирование ХЛ люминола и появление латентного периода, длительность которого прямо пропорциональна АОА или радикалперехватывающей активности образца. Второй метод основан на степени ингибирования аскорбат- и ферроиндуцированного окисления твина -80 до МДА. Оптическую плотность измеряют на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Clima RAC (Испания) при длине волны 532 нм через 48 часов инкубации при 40° С [72].

Показатель общей антиоксидантной активности плазмы крови в большей степени помогает клиницистам в решении таких задач, как выявление групп людей с высоким риском развития различных заболеваний, обоснование выбора антиоксиданта в лечении пациентов, мониторинг лечения и эффективности терапии [10; 112; 237].

1.2.1.6. Перекисное окисление липидов

Перекисное окисление липидов – это сложный химический процесс, присущий всем биологическим организмам и характеризующийся, прежде всего, активацией и деградацией липидных радикалов, встраиванием в липиды предварительно активированного молекулярного кислорода, реорганизацией двойных связей и полиненасыщенных ацилов липидов, разрушением мембранных липидов и, как следствие, самих биологических мембран и клеток [8; 33; 203].

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) считается физиологическим процессом, постоянно протекающим в клеточных мембранах и имеющим цепной, свободнорадикальный механизм [204; 215; 242]. Стадия иницирования начинается с внедрения свободного радикала (чаще всего это радикал гидроксила)

в биологическую мембрану липидов, он вступает в химическое взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами (LH) с образованием липидного радикала (L•): $\text{HO}\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{L}\cdot$ [191]. В результате этой реакции образуются органические перекиси и новый радикал, которые способствуют дальнейшему развитию окислительных реакций, имеющих цепной характер $\text{LOO}\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}\cdot$. Образовавшиеся радикалы инициируют новые цепи окисления липидов [163].

Липиды окисляются при помощи трех различных механизмов: 1) ферментативного окисления; 2) неферментативного, свободно-радикалопосредованного окисления и 3) неферментативного, или не радикального окисления [74; 283].

Принято считать, что процесс образования перекисей липидов (рисунок 1.5) осуществляется 2 путями: ферментативным (или НАДФН-зависимым) и неферментативным – аскорбатзависимым (аскорбиновая кислота регенерирует ионы за счет обратного восстановления Fe^{3+} до Fe^{2+}), активируемым металлами с переменной валентностью. По первому пути происходит образование перекисей липидов во всех мембранных структурах, а по второму – преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме клеток [212; 296].

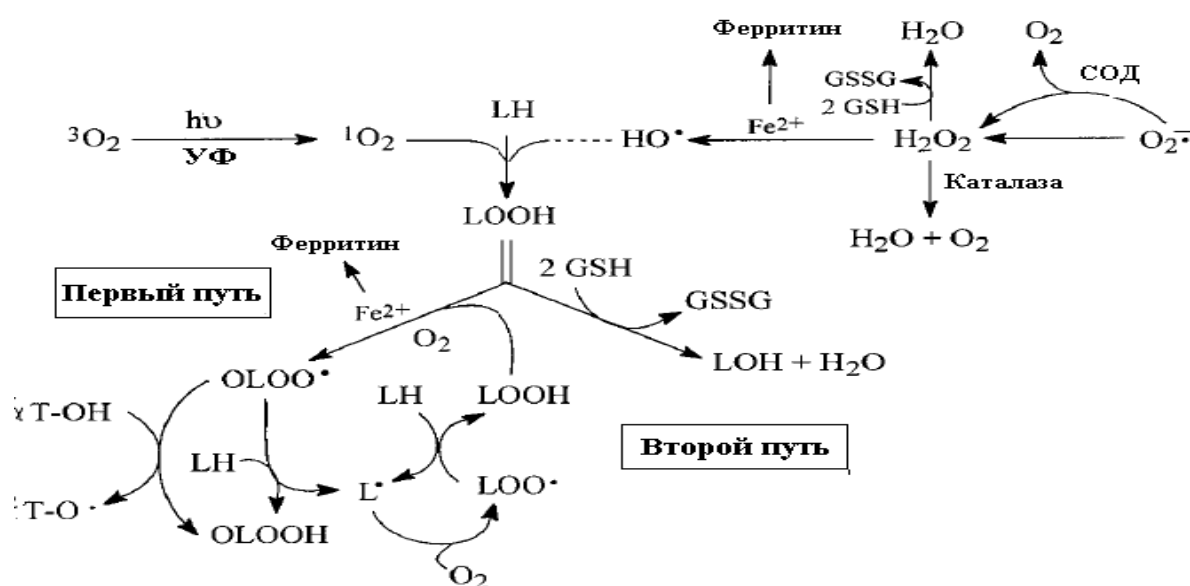


Рисунок 1.5 – Схема образования продуктов перекисного окисления липидов в клетке

Принято выделять 3 стадии (рисунок 1.6) образования свободных радикалов липидов, при ферментативном и неферментативном путях окисления перекисей: инициирование или зарождение цепи, разветвление или продолжение цепи и обрыв цепи [158; 283].

Индикаторами интенсификации процессов перекисного окисления липидов можно с уверенностью считать увеличение содержания хотя бы одного из его продуктов. Как известно, одним из основных субстратов свободно-радикальных реакций являются липиды [225]. В результате окисления жирных кислот образуются гидроперекиси (ацилгидроперекиси), которые затем метаболизируются во вторичные — малоновые диальдегиды (МДА). Мощным генератором свободных радикалов в организме являются лейкоциты, тромбоциты, эритроциты и гепатоциты. Так, к примеру, карбонильные продукты ПОЛ (рисунок 1.6) подавляют синтез ДНК, ингибируют ряд ферментов, модифицируют агрегацию тромбоцитов, увеличивают проницаемость капилляров, и проявляют еще множество других нежелательных эффектов. Генерированные в процессе пероксидации свободные радикалы, в свою очередь, вызывают повреждение структуры нуклеиновых кислот, в частности ДНК, деструкцию нуклеотидных коферментов, нарушение функций ферментов (в первую очередь SH-ферментов), модификацию различных биомолекул [32; 155].

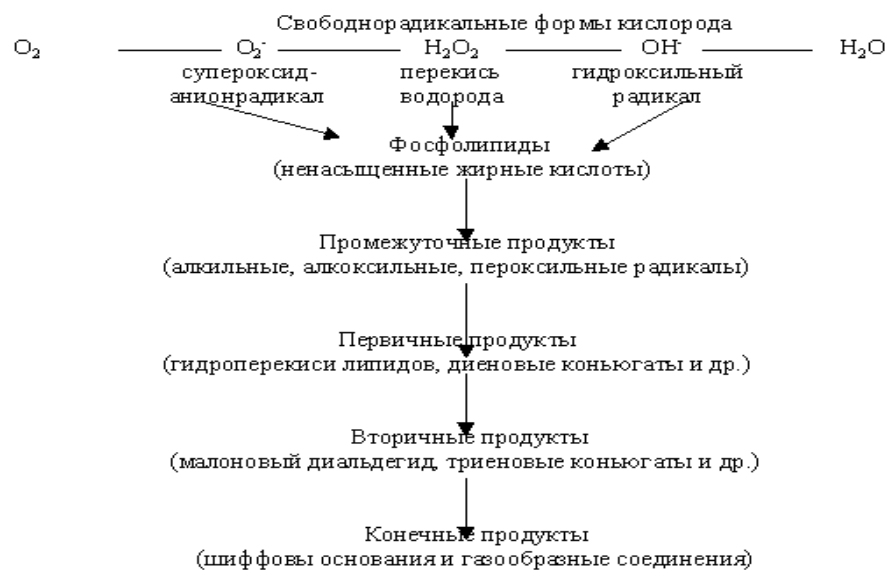


Рисунок 1.6 – Схема образования продуктов ПОЛ

Установлено, что на низком стационарном уровне реакции липопероксидации принимают участие в обновлении клеточных мембран, являясь универсальным модификатором их структуры и функции [83; 104]. Доказана роль ПОЛ в процессах фагоцитоза и уничтожения микроорганизмов, метаболизации ряда ксенобиотиков печенью и биосинтеза некоторых биологически активных веществ, например, простагландинов [226]. Имеются данные об участии процессов пероксидации липидов в проведении нервного импульса, клеточном делении и т. д. [208]. Субстратами ПОЛ являются полиненасыщенные жирные кислоты, а также основные липиды плазмы крови – холестерин и триглицериды [175]. Вследствие того, что первичным стабильным продуктом процесса окисления ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов являются гидроперекиси, данный процесс называют перекисным [78]. Результатом этого может быть перекисная дегградация молекул фосфолипидов, что влечёт за собой изменение структуры клеточных мембран и липопротеидов [238; 247; 249]. В результате появляются молекулы, содержащие сопряжённые двойные связи (диеновые конъюгаты), которые являются первичными продуктами ПОЛ. Показано, что первичные продукты ПОЛ в норме участвуют в регулировании проницаемости мембран, скорости роста организмов и пролиферации клеток [28]. Диеновые конъюгаты (ДК) относятся к токсическим метаболитам, которые оказывают повреждающее действие на липопротеиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты. При свободнорадикальном окислении арахидоновой кислоты происходит отрыв водорода в α -положении по отношению к двойной связи, что приводит к перемещению этой двойной связи с образованием ДК [80].

Последующее развитие цепи происходит при присоединении кислорода, в результате чего образуются вторичные продукты ПОЛ – кетодиены и сопряжённые триены [177]. Конечные продукты перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот – это продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты, к числу которых относится малоновый диальдегид) и продукты полимеризации – поликонденсации липидов – шиффовы основания [28]. Конечные продукты ПОЛ способны существенно

влиять на функциональную активность фагоцитирующих клеток: ингибируют развитие дыхательного «взрыва» и продукцию супероксидного радикала нейтрофилами, фагоцитоз в моноцитах и нейтрофилах, обладают высокой хемотаксической активностью [28; 57]. Малоновый диальдегид (МДА) образуется только из жирных кислот с тремя и более двойными связями [138]. МДА принадлежит важная роль в синтезе простагландинов, прогестерона и других стероидов [176]. Отрицательная роль малонового диальдегида заключается в том, что он сшивает молекулы липидов и понижает текучесть мембраны [296]. Вследствие этого мембрана становится более хрупкой, нарушаются процессы, связанные с изменением поверхности мембраны. Продуктами взаимодействия малонового диальдегида (МДА) с аминокислотами являются шиффовы основания [162].

Малоновый диальдегид является вторичным продуктом свободнорадикального окисления липидов. В результате взаимодействия малонового диальдегида с N-концевыми остатками аминокислот, аминогрупп фосфолипидов и белков происходит образование конъюгированных флуоресцирующих соединений типа оснований Шиффа. Степень эндогенной интоксикации при интенсификации процессов окисления липидов прямо пропорциональна количественному содержанию малонового диальдегида в крови. Поэтому при избыточной активации свободно-радикального окисления происходит повышение малонового диальдегида, а его снижение наблюдается при угнетении липидного обмена. Данный продукт перекисного окисления очень токсичен и химически активен, способен оказывать повреждающее действие, которое проявляется в нарушении структурно-функционального состояния биомембран, в дальнейшем фрагментации и разрушении, способствует увеличению их проницаемости для ионов кальция, что играет важную роль в возникновении избытка ионов кальция в клетке с реализацией его повреждающего действия. Утилизация их в организме происходит с очень низкой скоростью, и в результате этого они накапливаются, являясь балластом, нарушающим функциональное состояние биомембран клеток. Обладая высокой

реакционной способностью, первичные продукты свободно-радикального окисления оказывают повреждающее действие на различные биомолекулы и, в первую очередь, на белки [176; 296].

Процессы перекисного окисления липидов изучаются достаточно долгое время, еще в 1887 году А. Н. Бахом была выдвинута теория о соединении органических молекул и молекулярного кислорода с образованием в итоге гидроперекисей [25]. Процессы перекисного окисления липидов во многом определяют стабильность постоянства внутренней среды организма [131]. Результатом разбалансировки этой системы в организме является накопление токсичных продуктов, которые пагубно влияют на метаболические, гормональные и иммунологические процессы [26].

Согласно современным представлениям, именно активация свободнорадикально окислительных реакций является главным патогенным фактором множества патологических состояний и заболеваний, сопровождающихся нарушением биологическим барьером клеточных мембран. Усиление активности данного процесса ведет к нарушению функций клетки, и как следствие этого – развитию патологии. Основная физиологическая роль перекисного окисления липидов заключается в процессах самообновления и самоперестройки биологических мембран, ионного транспорта, регуляции активности мембраносвязывающих ферментов и других физиологических реакций. Значение процессов липопероксидации для организма заключается в обновлении мембран клеток и поддержании посредством этого структурного гомеостаза и энантиостаза [29].

В клинической медицине свободно-радикальную патологию со всеми её особенностями принято называть «окислительный или оксидативный стресс», основу которого составляют свободно-радикальные реакции ПОЛ [85]. Именно процессы перекисного окисления липидов – является патогенетическим фактором заболеваний сердечно-сосудистой системы: ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия, пищеварительной системы: панкреатит, желчекаменная болезнь, холецистит, нервной системы: паркинсоническом

синдроме, параноидной шизофрении, ВИЧ и алкоголь и различной этиологии инфекционной патологии: псориаз, чумная интоксикация, сифилис [65]. Развитие всех вышеперечисленных патологий непосредственно связано с функциональными нарушениями биологических мембран, которые вызывают серьезные, чаще всего необратимые патологические изменения во внутриклеточных процессах, ведущие к гибели клетки и всего организма в последующем [100; 104].

Возрастание уровня перекисного окисления липидов наблюдается при множестве различных патологических состояний и интоксикациях. Установлено, что реакция организма на молекулярном уровне в ответ на воздействие внешних экстремальных факторов, характеризуется усилением процессов окисления целого ряда биосубстратов тиоловых соединений белковой и небелковой природы, нуклеиновых кислот, аскорбиновой кислоты, липидов и ряда других веществ [117]. Данные изменения системы липопероксидации наблюдаются при различных интоксикациях: отравление тетрахлорметаном, ксеноном при воздействии органических растворителей в производстве ионами железа, кадмием, окислами азота, пестицидами, алюминиевой пылью [84; 119; 229].

1.2.2. Неферментативное звено антиоксидантной системы защиты

Классификация антиоксидантов по происхождению [1; 4; 111]:

1. Антирадикальные средства:

1.1. Эндогенные соединения: а-токоферол (витамин Е), кислота аскорбиновая (витамин С), ретинол (витамин А), б-каротин (провитамин А), убихинон (убинон), ликопин.

1.2. Синтетические препараты: ионол (дибунол), эмоксипин, пробукол (фенбутол), диметилсульфоксид (димексид), олифен (гипоксен).

2. Антиоксидантные ферменты и их активаторы: супероксиддисмутаза (эрисод, орготеин), натрия селенит.

3. Блокаторы образования свободных радикалов: аллопуринол (милурит), антигипоксанты.

По химической природе выделены следующие классы антиоксидантов:

1. Ферментативные антиоксиданты - собственные средства внутриклеточной защиты – супероксиддисмутаза.

2. Соединения, содержащие фенольные группы.

2.1. Фенольные антиоксиданты $Ar(OH)_n$: Токоферолы (витамин E);

2.2. Хиноны: убихиноны (коэнзимы Q10), менахинон (витамин K2), родохинон.

2.3. Флавоноиды: флавонолы, флавоны, катехины, флаваноны, антоцианидины, изофлавоны, лейкоцианидины, дигидрофлавонолы, халконы:

2.4. Каротиноиды;

2.5. Аскорбиновая кислота.

3. SH – содержащие соединения.

3.1. Легкоокисляющиеся пептиды.

3.2. Пролин

4. Хелаторы ионов металлов переменной валентности.

4.1. Металлопротеины: сидерофилины: трансферрины, ферритины, гемосидерин, медьсвязывающий церулоплазмин.

4.2. Мочевая кислота и другие пурины

5. Другие антиоксиданты: гормоны - антиоксиданты: женские половые гормоны, мелатонин.

1.2.2.1. Растительные антиоксиданты

Все антиоксиданты (АО) классифицируют на препараты косвенного и прямого действия [52]. Кроме того, по происхождению АО подразделяют на две группы: ферментативной [супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза] и неферментативной природы. Последние подразделяют на вещества эндогенного (коэнзим Q10, глутатион, а-липоевая кислота и др.) и

экзогенного происхождения – витамины А, С, Е, каротиноиды, полифенолы (флавоноиды) и их синтетические аналоги – низкомолекулярные соединения (убихинон, глутатион), микроэлементы (селен) [82; 143].

В соответствии с простейшей классификацией, антиоксиданты подразделяют на естественные и синтетические. Естественные антиоксиданты – биоантиоксиданты – в первом приближении можно подразделить на биофлавоноиды (полифенолы), водо- и жирорастворимые витамины и микроэлементы, серосодержащие соединения – цистин, цистеин, метионин [115]. Естественными их называют на том основании, что источником их являются природные вещества, в основном пищевые продукты [144; 302].

Максимальное количество природных натуральных антиоксидантов наблюдается обычно в кожуре и коре растений и деревьев, а также в косточках, где хранится генетическая информация. Считается, что наиболее эффективные соединения - биофлавоноиды, которые лучше всего препятствуют разрушению и старению организма, находятся в тех составах, которые придают растениям их выраженную пигментацию или окраску. Биофлавоноиды способны снижать даже уровень холестерина в организме, а также тенденцию красных кровяных телец слипаться и образовывать тромбы, как, впрочем, и многое другое. Наиболее выраженными антиоксидантными свойствами обладают: витамин Е и расторопша [144; 240].

1.2.2.1.1. Витамин Е

Жирорастворимый витамин Е представлен в нескольких гомологичных формах (α , β , γ - токоферол) среди которых наибольшей антиоксидантной активностью обладает α -токоферол [208]. Витамин Е (α -токоферол) самый распространённый липофильный антиоксидант, входящий в состав клеточных мембран [298]. Известно восемь природных веществ – членов семейства витамина Е. Эти соединения имеют 3 асимметрических атома углерода, давая 8 оптических изомеров. Наиболее эффективной формой является α -токоферол [309]. После

взаимодействия с радикалами, токоферол преобразуется в токоферолхинон и впоследствии токоферилхинон. Как было отмечено выше, токоферол способен восстанавливаться в активную форму под действием аскорбиновой кислоты [169]. Токоферолы также выступают в качестве мембран-стабилизирующих агентов. Наряду с этим, в присутствии переходных металлов способны проявлять прооксидантные свойства. Значительная эффективность действия α -токоферола, как природного антиоксиданта, обусловлена чрезвычайно высокой антирадикальной активностью (константа скорости взаимодействия данной молекулы с перекисными радикалами составляет $2,0 \times 10^7$ л/моль с, что на два порядка выше аналогичных констант скоростей для многих известных синтетических и природных антиоксидантов) [221]. Также для α -токоферола характерна функциональная стабилизация билипидного слоя мембран посредством формирования стабильных комплексов с полиненасыщенными ацилами липидов. Витамин Е отдаёт атом водорода радикалу липида $ROO\cdot$, восстанавливает его до гидропероксида ($ROOH$), прерывает ПОЛ, а сам превращается в свободный радикал [211]. Свободный радикал витамина Е стабилен и не поддерживает ПОЛ, он взаимодействует с радикалами липидных перекисей, восстанавливает их, а сам превращается в стабильную окисленную форму — токоферолхинон [310].

Препараты на основе витамина Е: альфа-токоферола ацетат; АЕ ВИТамин; Essential Vitamins «Натуральный витамин Е»; Fortevit; Multivitamin Gummies; Компливит Актив и многие другие [298].

1.2.2.1.2. Расторопша

Расторопша пятнистая (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) – многолетнее растение семейства сложноцветных (Asteraceae, Compositae) высотой до 2 м с ланцетовидными листьями, покрытыми шипами, с белыми или лиловыми цветками. Экстракт из семян растения содержит такие вещества как силибин, силикристин и силидианин. Все три компонента имеют фенилхромановую

структуру и являются производными таксифолина и кониферилового спирта. Антиоксидантные свойства расторопши проявляются в ингибировании процессов образования свободных радикалов. Терапевтическая эффективность препаратов из плодов расторопши пятнистой базируется на нескольких механизмах действия: силибин стимулирует синтез белка, что приводит к повышению восстановительной способности клеток, в частности печени; все флаволигнаны оказывают стабилизирующее действие на клеточные мембраны и предотвращают проникновение токсинов во внутреннюю часть клетки [27]. Помимо гепатопротекторной, силимарин проявляет противораковую, противовоспалительную, иммуномодулирующую и кардиопротекторную активность [4, 28, 30]. Силибин по сравнению с другими лекарственными соединениями обладает весьма уникальной способностью нейтрализовать действие ядов бледной поганки, причем его предшественники при биосинтезе – конифериловый спирт и таксифолин – такую активность не проявляли [36]. Связывая некоторые разновидности реактивных форм кислорода, расторопша действует как поглотитель, препятствует перекисному окислению липидов мембран и таким образом модулирует проницаемость мембран [144]. Существуют различные формы выпуска добавки на основе расторопши пятнистой. Например: чай из листьев и семян растения, настойки, порошок из семян, свежие листья или семена в салатах, соках, смузи, а также таблетки или капсулы [27].

Препараты и лекарства с действующим веществом – Расторопша пятниста экстракт плодов: гепабене; карсил; легалон и другие [64].

Анализ литературных данных позволяет сделать вывод о масштабном применении фунгицидных технологий в растениеводческом комплексе агропромышленного производства РФ, что является особенно актуальным в условиях импортозамещения агропродукции. Вместе с тем, остро встает вопрос анализа качества сельскохозяйственной продукции на предмет содержания остаточных количеств фунгицидов, а также оценки их экотоксического действия на биоэкосистемы. Широкое распространение среди применяемых фунгицидов имеет дитиокарбаматный фунгицид тирам, который способен разлагаться до

более опасных метаболитов в тканях растений и почве и представляет экологическую опасность для живых организмов.

Рядом исследователей показано, что интоксикация тирамом приводит к формированию окислительного стресса в организме. Это проявляется в различных изменениях отдельных компонентов антиоксидантной системы. Например, в исследовании Grosicka et al. (2005), направленного на изучение содержания, восстановленного глутатиона в фибробластах китайского хомячка, было показано, что интоксикация пестицидом приводит к истощению запасов GSH, а также к активации процессов перекисного окисления липидов на фоне формирования эксудативного стресса.

В работе Dagmara Kurpios-Piec (2015 г) было изучено влияние тирама на формирование провоспалительных медиаторов в мышечных макрофагах. Исследователями было обнаружено, что при использовании фунгицида в качестве эндотоксина происходит активное образование реактивных форм кислорода и увеличение концентрации окисленного глутатиона в анализируемых образцах.

В исследовательском проекте Samreen Salam (2019 г) было проанализировано влияние фунгицида тирам на формирование окислительного стресса в эритроцитах человека *in vitro*. Полученные данные указывают на повышение окисления липидов и подавление активности основных антиоксидантных ферментов, за счет образования избыточного количества активных форм кислорода. Также было отмечено формирование дисбаланса между содержанием восстановленных и окисленных форм глутатиона.

Однако в доступной литературе отсутствует информация о комплексном исследовании оксидативного стресса при действии тирама, включающего анализ генерации активных форм кислорода и как следствие нарушение функционирования ферментативного и неферментативного звена АОС, липопероксидации, а также исследованиях по разработке коррекционных мероприятий по нормализации работы системы антиоксидантной защиты организма с использованием растительных антиоксидантов. Данная концепция легла в основу настоящего диссертационного исследования.

.....

На основании вышеизложенной информации можно сделать вывод, что применение пестицидных препаратов, в частности, фунгицида тирам, является иницирующим фактором развития окислительного стресса, что проявляется в усилении свободнорадикальных процессов в организме.

В результате усиления образования свободных радикалов, происходит включение механизмов антиоксидантной защиты. При этом первичным звеном, является ферментативный уровень защиты организма, представленный ферментами супероксиддисмутазой (дисмутирует супероксидные радикалы) и каталазой (обеспечивает детоксикацию нерадикальной активной формы кислорода – H_2O_2), а также ферментами глутатионового ряда – глутатионтрансферазой (восстанавливает органические гидроперекиси до спиртов, с использованием восстановленного глутатиона в качестве кофактора), глутатионпероксидазой (восстанавливает свободную перекись водорода до воды) и глутатионредуктазой (восстанавливает окисленную форму глутатиона до его сульфгидрильной формы). Помимо активации ферментов, происходит включение неферментативного звена антиоксидантной системы. Наиболее важным соединением является глутатион, который служит эффективным скэвенджером свободных радикалов. Однако при чрезмерном образовании свободных радикалов, в том числе, реактивных форм кислорода, наблюдается снижение концентрации восстановленного глутатиона и увеличение окисленной его формы. Соотношение GSH/GSSG определяет клеточный редокс статус организма.

Внедрения свободных радикалов в биологические мембраны липидов приводит к запуску сложного химического процесса – перекисного окисления липидов. Образовавшиеся, в ходе данного процесса, образуются первичные продукты, гидроперекиси и диеновые конъюгаты, которые в последующем, метаболизируются во вторичные продукты, в частности, в малоновый диальдегид. Увеличение его содержания в клетках организма приводит к нарушению структурно-функционального состояния биомембран.

Помимо антиоксидантной системы, в борьбе с избыточным количеством свободных радикалов, могут помочь антиоксиданты, в том числе и естественные.

Естественными их называют на том основании, что источником их являются природные вещества, в основном пищевые продукты. Антирадикальной активностью обладают витамин Е, способный стабилизировать билипидный слой мембран, и экстракт расторопши пятнистой, препятствующий перекисному окислению липидов мембран. Также препарат расторопши имеет выраженные гепатопротекторные свойства. Данные знания позволяют использовать витамин Е и расторопшу в качестве антиоксидантных препаратов при развитии окислительного стресса в организме.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Эксперимент был проведен на 80 крысах – половозрелых самцах линии Вистар возрастом 2 месяца с массой тела от 200 до 220 граммов, которые содержались поодиночке в условиях вивария в осенне-зимний период и в качестве стандартного пищевого рациона получали комбикорм полнорационный для лабораторных животных «Комбикормовая провинция» (ГОСТ 34566-2019). 1 группа - здоровые, интактные крысы, которые являлись биологическим контролем. 2, 3, 4 и 5 группы получали тирам вместе с гранулированным кормом в дозе 1,6 мг, что является 1/50 LD₅₀, в течение 28 дней. Гранулы комбикорма измельчали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния, добавляли 2 мл дистиллированной воды и взвешенный тирам, формировали гранулы и сушили на открытом воздухе в течение 12 часов. Таким образом, интоксикация достигалась путем естественного кормления, исключая физиологический стресс при проведении эксперимента. Забор крови и печени производился через равномерные промежутки времени: на 7-е, 14-е, 21-е и 28-е сутки, для оценки динамики негативных последствий интоксикации тирамом и компенсаторных механизмов антиоксидантной защиты. Забой проводился под эфирным наркозом. Шестая группа после 28 дней интоксикации тирамом 30 дней получали обычную еду, согласно их стандартному рациону. В седьмой группе моделировалась субхроническая интоксикация на протяжении 28 суток, с последующим применением антиоксиданта – витамина Е в течение 30 суток. В перерасчете на 1 кг веса человека необходимо 1,43 мг/кг препарата. Коэффициент пересчета дозы с отдельного животного на человека составляет – 39,0. Для крысы массой 200 грамм коэффициент пересчета составляет 6,5. Следовательно, расчетная терапевтическая доза витамина Е для экспериментальных крыс-самцов линии Вистар массой 200 грамм составляет: $(1,43 * 39) / 6,5 = 8,58$ мг/кг. В группе восемь проводилась субхроническая интоксикация в течение 28 суток, с последующим

использованием антиоксиданта – расторопши на протяжении 30 суток. В перерасчете на 1 кг веса человека необходимо 2,29 мг/кг препарата. Расчетная терапевтическая доза расторопши для экспериментальных крыс-самцов линии Вистар массой 200 грамм составляет: $(2.29 * 39) / 6,5 = 13,74$ мг/кг. В 7 и 8 группах антиоксиданты вводили вместе с гранулированным кормом, при этом алгоритм формирования гранул аналогичен формированию гранул с пестицидом.

Расчет дозы препарата тирам выполнялся исходя из токсикологических данных: LD₅₀ для крыс составляет 400 мг/кг. [14]. В связи с тем, что в эксперименте использовались дозы 1/50 LD₅₀, то расчетная доза для экспериментальных крыс-самцов линии Вистар составила: $400 \text{ мг/кг} * 0,02 \text{ кг} / 50 = 1,6$ мг [124].

Сроки забора биоматериалов были выбраны для оценки изменений антиоксидантного статуса при субхронической интоксикации для анализа динамики изменений и компенсаторных возможностей организма.

Исследование одобрено региональным этическим комитетом Курского государственного медицинского университета (протокол № 7 от 30 ноября 2018 г.), выполнено с соблюдением этических принципов проведения научных медицинских исследований с участием экспериментальных животных (г. Страсбург, Франция, 1986). Материалом исследования явилась плазма, эритроцитарная масса крови и гомогенат печени.

2.2. Методы исследования

Подготовка материала для исследования

Для исследования отбирали – плазму крови, эритроцитарную массу и гомогенат печени экспериментального животного. Забой осуществляли декапитацией животных под эфирным наркозом. Забор крови производили с помощью пункции сердца. Кровь собирали в микроцентрифужные пробирки с гепарином (25 ед/мл), а затем центрифугировали при 4°C на 3000 об/мин в

течение 15 мин. Надосадочную жидкость содержащую плазму отбирали для дальнейшего анализа в микроцентрифужные пробирки объемом 50 мкл. Осадок эритроцитов ресуспендировали в 10,0 мл охлажденного 0,9% раствора NaCl, затем клетки осаждали путем центрифугирования при 2000 об/мин в течение 5 мин. В последующем эритроциты трижды промывали раствором 0,9% NaCl. Плотный осадок эритроцитов использовали для дальнейшей работы. Для получения гомогената печени забирали часть органа, отмывали его от крови холодным 0,9 % раствором хлорида натрия в течение 35-50 секунд. Перед исследованием печень взвешивали, затем измельчали и гомогенизировали с помощью пестикового гомогенизатора, добавляя при этом 0,1 М калий-фосфатный буфер с pH 7,4, предварительно охлажденный до 0°C, в соотношении «ткань-буфер» 1:6. Из полученных гомогенатов проводили отбор проб для дальнейших исследований. Пробы хранили при температуре -80°C (низкотемпературный морозильник SUFsg 5001, Liebherr), в лабораторной зоне без дальнейшей транспортировки.

После забора и пробоподготовки биообъектов было проведено лабораторное исследование, включающее определение функциональной активности антиоксидантной системы. Для исследования использовались следующие наборы: Catalase Assay Kit, 707002, 96 тестов (Cayman Chemical, USA); CEA634Ge ELISA Kit for Diene Conjugates (Cloud-Clone Corp., USA); CEA597Ge ELISA Kit for Malondialdehyde (MDA) (Cloud-Clone Corp., USA); Superoxide Dismutases Assay Kit, 706002, 96 тестов (Cayman Chemical, USA); Glutathione Reductase Assay, STA-812, 100 тестов (Cell Biolabs, USA); Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit, K762, 100 тестов (BioVision, USA); GST Colorimetric Activity Assay Kit, K263, 100 тестов (BioVision, USA); OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit (Green Fluorescence), STA-347, 96 тестов (Cell Biolabs, USA); набор реагентов для определения антиоксидантов в микропланшетном формате, 709001, 96 тестов (Cayman Chemical, USA); CEA294Ge ELISA Kit for Glutathione (GSH) (Cloud-Clone Corp., USA) и CEK518Ge ELISA Kit for Oxidized Glutathione (GSSG) (Cloud-Clone Corp., USA). Для проведения интоксикации использовали тирам (137-26-8) чистотой 97% (Sigma-Aldrich, USA). Для проведения коррекции использовали

витамин Е (токоферола ацетат) (Химфармпродукт, Россия) и расторопшу (Грин Сайд, Россия).

Определение каталазы

Активность фермента определяли биохимическим методом в микропланшетном формате с помощью полуавтоматического биохимического анализатора Clima RAC (Испания). Диапазон измерения от 2 до 35 нмоль/мин/мл. Чувствительность: 2 нмоль/мин/мл. Длина волны измерения 540 нм. Анализ основан на реакции фермента с метанолом в присутствии H₂O₂. Образующийся в реакции формальдегид детектируется колориметрически при взаимодействии с хромогеном 4-амино-3-гидразин-5-меркапто-1,2,4-триазол (Пурпальд), при котором происходит изменение бесцветной окраски на фиолетовую.

Определение супероксиддисмутазы

Активность фермента определяли непрямым спектрофотометрическим методом, основаным на использовании реакции супероксид-зависимого окисления кверцетина (флавоноид растительного происхождения), протекающей в щелочной среде в присутствии тетраметилэтилендиамина. Реакция сопровождается обесцвечиванием рабочего раствора в области пропускания с максимумом при 406 нм. Фермент супероксиддисмутаза перехватывает образующиеся в этих условиях супероксид-радикалы и ингибирует окисление кверцетина. При времени инкубации 20 мин степень ингибирования строго количественно зависит от концентрации СОД в диапазоне 2-10 U/л. Анализ проводили с использованием микропланшетного ридера (Varioscan Thermo Fisher Scientific). Содержание фермента в биологическом материале рассчитывается с помощью уравнения, полученного на основании калибровочного графика.

Определение глутатиона восстановленного

Исследование основано на конкурентном методе иммуноферментного анализа (ИФА). В наборе для исследования использовался микропланшет, сорбированный моноклональными антителами специфичными к GSH. Между GSH, меченным биотином, немеченым GSH (содержащимся в образцах и контроле) и сорбированными антителами специфичными к GSH происходит конкурентная реакция в процессе инкубирования в течение 30 мин при температуре 37° С. Несвязавшийся конъюгат удаляли отмывкой. Затем авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (Horseradish peroxidase, HRP) добавляли в каждую лунку планшета и проводили инкубацию в течение 10 мин при температуре 37° С. Далее тщательно удаляли следы жидкости из планшета и отправляли его в микропланшетный ридер Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA), в котором проводили исследование при длине волны 450 нм. Количество связанного конъюгата пероксидазы хрена обратно пропорционально концентрации GSH в образце.

Определение глутатиона окисленного

Анализ основан на конкурентном методе ИФА. Микропланшет в наборе сорбирован моноклональными антителами специфичными к овальбумину (OVA). Конкурентная реакция происходит в процессе инкубации в течение 30 мин при температуре 37°С между OVA, меченным биотином, немеченым OVA (содержащимся в образцах или контроле) и сорбированными антителами специфичными к OVA. После инкубации не связавшийся конъюгат удаляли отмывкой. Затем в микропланшет добавляли авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP) и проводили инкубацию в течение 10 мин при температуре 37° С. Далее тщательно удаляли следы жидкости из планшета и отправляли его в микропланшетный ридер Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA), для проведения исследования при длине волны 450 нм.

Количество связанного конъюгата пероксидазы хрена обратно пропорционально концентрации OVA в образце.

Определение глутатионпероксидазы

Анализ проводили с использованием набора реагентов фирмы BioVision. 100 мг ткани печени смешивали с 0,2 мл Assay Buffer. Центрифугировали при $t +4^{\circ}\text{C}$ 15 мин (10000g). Активность фермента определяли с использованием гидропероксида кумола в качестве субстрата. Анализ проводили с использованием набора реагентов фирмы Cell Biolabs на микропланшетном ридере (Varioscan Thermo Fisher Scientific) при оптической плотности 340 нм. GPx снижает концентрацию гидропероксида кумола при окислении GSH до GSSG. Окисленный глутатион восстанавливается с использованием NADPH. Снижение содержания НАДФН прямо пропорционально активности GPx. Одна единица активности GPx была определена 1 мкмоль NADPH к NADP⁺ за 1 мин.

Определение глутатионредуктазы

Для анализа в 96-луночный планшет добавили 25 мкл раствора 1X NADPH в каждую лунку, а затем по 100 мкл подготовленных стандартов глутатионредуктазы и исследуемых образцов. Затем в каждую лунку микропланшета внесли по 50 мкл 1X хромогена и перемешали. Завершающим этапом было внесение в каждую лунку планшета 25 мкл глутатиона дисульфида (GSSG). После перемешивания планшет немедленно отправляли в микропланшетный ридер Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA) и проводили измерение оптической плотности при длине волны 405 нм с интервалом в 1 минуту в течение 10 минут (кинетический анализ).

Определение ROS

Анализ проводили с использованием набора реагентов фирмы Cell Biolabs. Ресуспендировали 10-50 мг/мл ткани печени в PBS. Гомогенизировали на льду. Полученный гомогенат центрифугировали при температуре $t +4^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин (10000g). Производили забор надосадочной жидкости в эпиндорфы в объеме 100 мкл. Последующий анализ проводили с использованием набора реагентов фирмы Cell Biolabs на микропланшетном ридере (Varioscan Thermo Fisher Scientific) при длине волны 480 нм. Концентрацию перекиси водорода в опытных пробах определяли по калибровочной кривой. Набор также предлагает другой стандарт, флуоресцентную метку DCF. Полученную стандартную кривую DCF можно использовать для сравнения суммарного содержания таких реактивных форм кислорода как перекись водорода и пероксидный радикал в двух группах образцов, что позволяет рассчитать, во сколько раз или на сколько процентов отличается содержание ROS, детектором которых является DCF.

Определение глутатионтрансферазы

Анализ проводили с использованием набора реагентов фирмы BioVision на микропланшетном ридере Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA) при длине волны 340 нм. В качестве субстрата использовали 1-хлор, 2,4-динитробензол.

Общая антиоксидантная активность

ОАА определяли методом основанным на степени ингибирования аскорбат- и ферроиндуцированного окисления твина -80 до МДА. Оптическую плотность измеряли на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Clima RAC (Испания) при длине волны 532 нм через 48 часов инкубации при 40°C .

Определение диеновых конъюгатов

Содержание ДК определяли спектрофотометрическим методом. К исследуемым образцам объемом 0,5 мл, разведенным 5мМ ТРИС-НСI буфером с рН 7,6 в соотношении 1:19, добавляли экстрагирующую смесь гептана с изопропиловым спиртом (1:1 по объему) в количестве 4,5 мл. Далее активным встряхиванием в течение 5 минут пробы тщательно перемешивали, после чего отстаивали до образования четкой границы между фазами. Затем отбирали гептановую (верхнюю) фазу в количестве 0,5 мл и добавляли к ней 96% этиловый спирт в количестве 2,5 мл. В кювете с длиной оптического пути 10 мм определяли оптическую плотность раствора против этилового спирта с гептаном (соотношение 5:1) при длине волны 233 нм с помощью полуавтоматического биохимического анализатора Clima RAC (Испания). С учетом разведения с использованием молярного коэффициента светопоглощения на указанной длине волны ($\epsilon=2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) производили расчет концентрации диеновых конъюгатов.

Определение малонового диальдегида

Для определения концентрации МДА использовался метод конкурентного ингибирования с применением иммуноферментного анализа при длине волны 450 нм. Моноклональные антитела, специфичные к МДА, были предварительно нанесены на микропланшет. Реакция конкурентного ингибирования запускается между меченым биотином МДА и немеченым МДА с предварительно нанесенными антителами, специфичными к МДА. После инкубации несвязанный конъюгат смывали. Далее авидин конъюгированный пероксидазой хрена (HRP) добавляли в каждую лунку микропланшета и инкубировали с помощью микропланшетного ридера Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA). Количество связавшегося конъюгата HRP обратно пропорционально

концентрации МДА в образце. Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации МДА в образце.

Статистический анализ

Полученные данные статистически обрабатывались с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 13.0» (Stat Soft, USA) [121]. Для определения нормальности распределения признака использовали критерий Шапиро-Уилка. Результаты исследования представлены как среднее значение со стандартной ошибкой ($M \pm m$). Для определения статистически значимых различий между двумя независимыми группами использовался t-критерий Стьюдента. Для сравнения нескольких групп применяли однофакторный дисперсионный анализ One-way ANOVA. При обнаружении статистически значимых отличий проводили апостериорные сравнения с помощью критерия Тьюки. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Показатели антиоксидантной системы в условиях пестицидной интоксикации тирамом

В результате проведенной серии экспериментов по изучению основных показателей антиоксидантной системы крови и гомогената печени крыс в условиях субхронической интоксикации пестицидным препаратом тирам получены и представлены (таблица 3.1, 3.2, 3.3) следующие данные.

Таблица 3.1 – Влияние субхронической интоксикации тирамом на показатели антиоксидантной защиты организма в плазме крови

Показатель	M±m				
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
	Контроль (интактные)	Интоксикация Тирамом 7 сутки	Интоксикация Тирамом 14 сутки	Интоксикация Тирамом 21 сутки	Интоксикация Тирамом 28 сутки
ROS, мкмоль/л	0,26±0,02	0,50±0,05*	0,61±0,06***	0,72±0,07***	0,85±0,08***
ОАА, ммоль/л	66,43±8,06	60,28±6,25	53,84±6,25	46,22±4,69*	40,29±4,18*
GSH, мкг/мл	148,43±14,16	90,15±9,38**	81,52±8,44**	60,94±6,21***	56,33±6,90***
GSSG, мкг/мл	0,69±0,06	1,43±0,14*	1,76±0,17***	1,93±0,19***	2,28±0,22***
GST, мЕд/мл	0,41±0,04	0,50±0,05	0,55±0,05*	0,61±0,06*	0,71±0,07**
GPx, мЕд/мл	40,12±4,75	59,65±5,95*	61,73±6,56*	58,42±6,77*	56,98±5,44*
GSR, мЕд/мл	4,75±0,53	7,23±0,73	9,39±0,93*	11,44±1,21***	12,64±1,24***
КАТ, мкат/л	11,99±1,24	10,36±1,11	8,04±0,87*	7,16±0,85*	6,82±0,80*
СОД, у.е.	17,12±1,72	16,98±1,71	14,82±1,52	13,93±1,47	12,11±1,24*
МДА, моль/л	1,12±0,16	1,68±0,19*	1,84±0,22*	2,15±0,22*	2,80±0,28***
ДК, мкмоль/л	0,27±0,03	0,38±0,04*	0,44±0,05*	0,63±0,08**	0,72±0,10***

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с группой «контроль (интактные)», ** – p<0,01 по сравнению с группой «контроль (интактные)», *** – p<0,001 по сравнению с группой «контроль (интактные)»

Таблица 3.2 – Влияние субхронической интоксикации тирамом на показатели антиоксидантной защиты организма в эритроцитарной массе крови

Показатель	M±m				
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
	Контроль (интактные)	Интоксикация Тирамом 7 сутки	Интоксикация Тирамом 14 сутки	Интоксикация Тирамом 21 сутки	Интоксикация Тирамом 28 сутки
ROS, мкмоль/л	115,24±12,04	148,18±14,24	155,12±15,77	159,23±16,43*	164,38±16,48*
GSH, мкг/мл	575,16±58,99	358,90±36,90*	267,15±26,55***	150,82±15,32***	152,49±15,63***
GSSG, мкг/мл	5,24±0,54	9,73±0,95**	8,75±0,94*	9,04±0,98*	9,15±0,94*
GST, мЕд/мл	0,17±0,01	0,29±0,02*	0,34±0,03***	0,37±0,03***	0,40±0,04***
GPx, мЕд/мл	90,29±9,02	148,75±14,90*	135,31±13,75*	129,68±13,30*	125,44±12,66*
GSR, мЕд/мл	4,96±0,49	12,00±1,30**	11,15±1,15**	14,89±1,48***	15,76±1,76***
КАТ, ммоль/мин*гНв	7,10±0,86	6,86±0,77	6,23±0,69	4,25±0,48*	3,11±0,35**
СОД, ммоль/мин*гНв	6,34±0,68	5,11±0,62	4,89±0,61*	4,59±0,57*	3,92±0,40*
МДА, Нмоль/гНв	0,24±0,03	0,31±0,04	0,42±0,05*	0,97±0,10***	1,86±0,18***
ДК, усл. ед./мг белка	0,06±0,00	0,09±0,01*	0,12±0,01*	0,13±0,01*	0,24±0,03***

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с группой «контроль (интактные)», ** – p<0,01 по сравнению с группой «контроль (интактные)», *** – p<0,001 по сравнению с группой «контроль (интактные)».

Таблица 3.3 – Влияние субхронической интоксикации тирамом на показатели антиоксидантной защиты организма в гомогенате печени

Показатель	M±m				
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
	Контроль (интактные)	Интоксикация Тирамом 7 сутки	Интоксикация Тирамом 14 сутки	Интоксикация Тирамом 21 сутки	Интоксикация Тирамом 28 сутки
ROS, мкмоль/л	149,64±15,24	190,47±19,08	196,22±19,60	210,42±21,17*	212,18±21,53*
GSH, мкг/мл	850,72±89,06	570,40±59,00*	522,11±53,54*	500,81±52,43*	447,22±47,83*
GSSG, мкг/мл	6,27±0,64	12,10±1,21*	14,25±1,52***	15,10±1,54***	15,17±1,61***
GST, мЕд/мл	2,15±0,23	5,46±0,57***	5,72±0,66***	6,06±0,63***	6,15±0,73***
GPx, мЕд/мл	4,25±0,50	10,15±1,06***	9,55±1,00***	7,35±0,79*	6,75±0,68*
GSR, мЕд/мл	8,34±0,84	14,32±1,71*	15,76±1,62*	15,99±1,61**	17,41±1,86***
КАТ, мкмоль/г	7,28±0,84	5,39±0,57	4,13±0,59*	3,86±0,51**	3,16±0,40***
СОД, ед/мг	12,13±1,26	9,19±0,96	7,77±0,94*	6,25±0,70**	5,01±0,59***
МДА, нмоль/мл	0,98±0,13	1,56±0,21*	1,73±0,18*	1,84±0,19*	1,92±0,20*
ДК, ед. оптич. плотности/мг	0,19±0,02	0,42±0,05*	0,68±0,10***	0,85±0,09***	0,94±0,14***

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с группой «контроль (интактные)», ** – p<0,01 по сравнению с группой «контроль (интактные)», *** – p<0,001 по сравнению с группой «контроль (интактные)».

Все полученные, при проведении субхронической интоксикации тирамом, данные (группы 2-5) сравнивали с показателями контрольной группы.

Содержание ROS увеличивалось в плазме, эритроцитарной массе крови и гомогенате печени на протяжении всего периода экспериментальной интоксикации тирамом. Максимальные изменения исследуемого показателя были отмечены в группе 5. В плазме крови значение ROS увеличилось в 3,26 раза ($p < 0,001$), в эритроцитарной массе крови – в 1,42 раза ($p < 0,05$) и в гомогенате печени лабораторных животных – в 1,41 раза ($p < 0,05$), в сравнении со значениями группы контроля.

Общая антиоксидантная активность плазмы крови снижалась на протяжении всего периода моделирования субхронической интоксикации пестицидом и достигло максимально низких значений в группе 5. В сравнении со значениями группы 1 ОАА крови снизилась в 1,64 раза ($p < 0,05$).

Применение тирама привело к значительному снижению показателей GSH и повышению значений GSSG в плазме, эритроцитарной массе крови и гомогенате печени. Максимальные изменения были зарегистрированы в группе 5 во всех анализируемых образцах. На 28 день интоксикации значение восстановленного глутатиона снизилось в 2,63 раза ($p < 0,001$) в плазме крови, в 3,77 раза ($p < 0,001$) в эритроцитарной массе крови и в 1,90 раза ($p < 0,05$) в гомогенате печени, в сравнении со значениями группы 1. Значение окисленного глутатиона на 28 день интоксикации увеличилось в 3,30 раза ($p < 0,001$) в плазме крови, в 1,74 раза ($p < 0,05$) в эритроцитарной массе крови и в 2,41 раза ($p < 0,001$) в гомогенате печени, в сравнении с группой контроля.

Активность GST увеличивалась на протяжении всего периода моделирования субхронической интоксикации пестицидом во всех исследуемых образцах. Максимальные изменения зарегистрированы в группе 5: в плазме крови значение активности увеличилось в 1,73 раза ($p < 0,01$), в эритроцитарной массе крови – в 2,35 раза ($p < 0,001$) и в гомогенате печени – в 2,86 раза ($p < 0,001$), в сравнении со значениями группы 1.

Аналогичные изменения наблюдались и при исследовании активности GРх. Максимальное увеличение активности исследуемого показателя было достигнуто в группе 5: в плазме крови в 1,42 раза ($p<0,05$), в эритроцитарной массе крови – в 1,38 раза ($p<0,05$) и в гомогенате печени – в 2,09 раза ($p<0,05$), в сравнении со значениям группы контроля.

При исследовании активности антиоксидантных ферментов показано, что каталитическая активность глутатионредуктазы на протяжении всего периода хронической интоксикации тирамом увеличивалась во всех анализируемых образцах и на 28 сутки достигла максимальных значений (в плазме крови увеличение произошло в 2,66 раза ($p<0,001$), в эритроцитарной массе крови - в 3,17 раза ($p<0,001$) и в гомогенате печени – в 2,08 раза ($p<0,001$), в сравнении со значениями группы 1).

Значительное снижение активности каталазы и супероксиддисмутазы, во всех исследуемых образцах, наблюдалось после приема лабораторными животными тирама в течение 28 суток (группа 5): в 1,75 ($p<0,05$) и 1,41 ($p<0,05$) раза, соответственно, в плазме крови; в 2,28 ($p<0,01$) и 1,61 ($p<0,05$) раза, соответственно, в эритроцитарной массе крови; в 2,30 ($p<0,001$) и 2,42 ($p<0,001$) раза, соответственно, в гомогенате печени крыс, в сравнении со значениями группы контроля.

При исследовании концентрации малонового диальдегида и диеновых конъюгатов отмечалось их увеличение во всех исследуемых образцах. На 28 день субхронической интоксикации тирамом, изучаемые показатели увеличились в плазме крови в 2,50 ($p<0,001$) и 2,66 ($p<0,001$) раза, в эритроцитарной массе крови – в 7,75 ($p<0,001$) и в 4,00 ($p<0,001$) раза, в гомогенате печени крыс – в 1,95 ($p<0,05$) и в 4,94 ($p<0,001$) раза, соответственно, по сравнению со значениями группы контроля.

3.2. Показатели антиоксидантной системы в условиях пестицидной интоксикации и компенсаторных возможностей организма при переходе на стандартный пищевой рацион

В результате проведенной серии экспериментов по изучению количественной характеристики основных показателей антиоксидантной системы крови и гомогената печени крыс в условиях субхронической интоксикации пестицидным препаратом тирам и влиянии стандартного пищевого рациона получены и представлены (таблица 3.4, 3.5, 3.6) следующие данные.

Таблица 3.4 – Влияние стандартного пищевого рациона на показатели антиоксидантной защиты организма в плазме крови после экспериментальной интоксикации тирамом

Показатель	M±m		
	Группа 1	Группа 5	Группа 6
	Контроль (интактные)	Интоксикация Тирамом 28 сутки	Интоксикация Тирамом+ Стандартный пищевой рацион
ROS, мкмоль/л	0,26±0,02	0,85±0,08	0,64±0,06 ^{***}
ОАА, ммоль/л	66,43±8,06	40,29±4,18	48,33±4,98 [*]
GSH, мкг/мл	148,43±14,16	56,33±6,90	90,32±9,24 ^{**}
GSSG, мкг/мл	0,69±0,06	2,28±0,22	1,99±0,20 ^{***}
GST, мЕд/мл	0,41±0,04	0,71±0,07	0,65±0,06 [*]
GPx, мЕд/мл	40,12±4,75	56,98±5,44	50,54±5,46
GSR, мЕд/мл	4,75±0,53	12,64±1,24	12,46±1,26 ^{***}
КАТ, мкат/л	11,99±1,24	6,82±0,80	7,96±0,89
СОД, у.е.	17,12±1,72	12,11±1,24	13,30±1,34
МДА, моль/л	1,12±0,16	2,80±0,28	2,55±0,25 ^{***}
ДК, мкмоль/л	0,27±0,03	0,72±0,10	0,64±0,08 ^{**}

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», *** – $p < 0,001$ по сравнению с группой «контроль (интактные)»; ^x – $p < 0,05$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{xx} – $p < 0,01$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{xxx} – $p < 0,001$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

Таблица 3.5 – Влияние стандартного рациона на показатели антиоксидантной защиты организма в эритроцитарной массе крови после экспериментальной интоксикации тирамом

Показатель	M±m		
	Группа 1	Группа 5	Группа 6
	Контроль (интактные)	Интоксикация Тирамом 28 сутки	Интоксикация Тирамом+ Стандартный пищевой рацион
ROS, мкмоль/л	115,24±12,04	164,38±16,48	128,04±13,64*
GSH, мкг/мл	575,16±58,99	152,49±15,63	320,75±34,65**
GSSG, мкг/мл	5,24±0,54	9,15±0,94	7,93±0,85
GST, мЕд/мл	0,17±0,01	0,40±0,04	0,31±0,03**
GPx, мЕд/мл	90,29±9,02	125,44±12,66	116,37±11,75
GSR, мЕд/мл	4,96±0,49	15,76±1,76	12,52±1,32***
КАТ, ммоль/мин*гНб	7,10±0,86	3,11±0,35	3,62±0,39**
СОД, ммоль/мин*гНб	6,34±0,68	3,92±0,40	4,16±0,52
МДА, нмоль/гНб	0,24±0,03	1,86±0,18	1,26±0,13*** XXX
ДК, усл. ед./мг белка	0,06±0,00	0,24±0,03	0,19±0,02***

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», *** – $p < 0,001$ по сравнению с группой «контроль (интактные)»; ^X - $p < 0,05$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{XX} - $p < 0,01$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{XXX} - $p < 0,001$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

Таблица 3.6 – Влияние стандартного рациона на показатели антиоксидантной защиты организма в гомогенате печени после экспериментальной интоксикации тирамом

Показатель	M±m		
	Группа 1	Группа 5	Группа 6
	Контроль (интактные)	Интоксикация Тирамом 28 сутки	Интоксикация Тирамом+ Стандартный пищевой рацион
ROS, мкмоль/л	149,64±15,24	212,18±21,53	180,30±18,56*
GSH, мкг/мл	850,72±89,06	447,22±47,83	760,79±80,36*
GSSG, мкг/мл	6,27±0,64	15,17±1,61	11,47±1,25
GST, мЕд/мл	2,15±0,23	6,15±0,73	4,38±0,51
GPx, мЕд/мл	4,25±0,50	6,75±0,68	5,73±0,59
GSR, мЕд/мл	8,34±0,84	17,41±1,86	15,31±1,63*

КАТ, мкмоль/г	7,28±0,84	3,16±0,40	4,32±0,46*
СОД, ед/мг	12,13±1,26	5,01±0,59	7,14±0,86*
МДА, нмоль/мл	0,98±0,13	1,92±0,20	1,63±0,18
ДК, ед. оптич. плотности/мг	0,19±0,02	0,94±0,14	0,82±0,09***

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», *** – $p < 0,001$ по сравнению с группой «контроль (интактные)»; ^x – $p < 0,05$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{xx} – $p < 0,01$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{xxx} – $p < 0,001$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

Все данные, полученные при переходе крыс на стандартный пищевой рацион, после проведения экспериментальной интоксикации тирамом (группа 6) сравнивали с контролем (группа 1) и со значениями, полученными на 28 день интоксикации (группа 5).

Отмечено незначительное восстановление содержание ROS после перехода на стандартный пищевой рацион. В плазме крови значение показателя снизилось в 1,32 раза ($p < 0,001$) в сравнении с 28 днем интоксикации тирамом. В эритроцитарной массе крови произошло снижение в 1,28 раза и в гомогенате печени – в 1,17 раза, в сравнении со значениями группы 5, но полученные данные не являются статистически достоверными. Однако контрольные значения содержания ROS не были достигнуты ни в одном из исследуемых образцов.

При переходе на стандартный пищевой рацион значение общей антиоксидантной активности было незначительно восстановлено и увеличилось в плазме крови в 1,20 раза, в сравнении со значениями группы 5. Данные изменения не являлись статистически значимыми. При этом контрольные значения показателя восстановлены не были.

Переход к стандартному рациону, после проведения субхронической интоксикации тирамом привел к незначительному восстановлению содержания GSH и GSSG во всех исследуемых образцах. Однако уровень контрольных значений исследуемых показателей в группе 6 достигнут не был. В плазме крови содержание GSH увеличилось в 1,60 раза ($p < 0,01$), а GSSG уменьшилось в 1,14 раза ($p < 0,001$) в сравнении со значениями группы 5. В эритроцитарной массе

крови содержание GSH увеличилось в 2,10 раза ($p < 0,01$), при этом GSSG уменьшилось в 1,15 раза, в сравнении со значениями 28-ого дня интоксикации пестицидом. В гомогенате печени содержание восстановленного глутатиона увеличилось в 1,70 раза ($p < 0,05$), а окисленного глутатиона уменьшилось – в 1,32 раза, в сравнении с группой 5. Данные изменения окисленного глутатиона в эритроцитарной массе и гомогенате печени не представляют статистической значимости.

При переходе на стандартный пищевой рацион, после проведения субхронической интоксикации пестицидом, отмечалось незначительное восстановление активности GST в сравнении со значениями группы 5, однако контрольные значения достигнуты не были в плазме и эритроцитарной массе. В 6 группе активность исследуемого показателя снизилась в 1,09 раза, в плазме крови; в 1,29 раза в эритроцитарной массе крови и в 1,40 раза в гомогенате печени крыс. Полученные изменения активности в плазме, эритроцитарной массе и гомогенате печени животных не представляют статистической значимости по сравнению с 28 днем интоксикации.

Активность GPx была незначительно восстановлена при переходе лабораторных животных на стандартный рацион. В плазме крови значение активности исследуемого показателя снизилось в 1,12 раза; в эритроцитарной массе крови – в 1,07 раза и в гомогенате печени крыс – в 1,17 раза, в сравнении со значениями 28-ого дня интоксикации. Однако полученные значения не представляли статистической значимости.

Исследование каталитической активности глутатионредуктазы при переходе на стандартный рацион после моделирования субхронической интоксикации, показало незначительное восстановление показателя и не достигло уровня контрольных значений. Активность GSR снизилась в 1,01 раза, в плазме крови; в 1,25 раза, в эритроцитарной массе крови и в 1,13 раза, в гомогенате печени, в сравнении со значениями группы 5, но полученные значения статистически не значимы.

Переход к стандартному рациону, после проведения субхронической интоксикации тирамом привел к незначительному восстановлению активности каталазы и супероксиддисмутазы. Однако уровень контрольных значений КАТ в эритроцитарной массе и КАТ и СОД в гомогенате печени в группе 6 достигнут не был. В плазме крови активность КАТ увеличилась в 1,16 раза, а СОД – в 1,09 раза, в сравнении со значениями группы 5. В эритроцитарной массе крови активность КАТ увеличилась в 1,16 раза, а СОД – в 1,06 раза, в сравнении со значениями 28-ого дня интоксикации пестицидом. В гомогенате печени активность каталазы увеличилась в 1,36 раза, а СОД – в 1,42 раза, в сравнении с группой 5. Во всех исследуемых средах изменения каталазы и супероксиддисмутазы не представляют статистической значимости.

Анализируя содержание малонового диальдегида и диеновых конъюгатов после перехода крыс на стандартный пищевой рацион было отмечено незначительное восстановление показателей в плазме, эритроцитарной массе и гомогенате печени. Однако уровень контрольных значений исследуемых показателей в группе 6, за исключением МДА в гомогенате печени, достигнут не был. В плазме крови содержание МДА уменьшилось в 1,09 раза, а ДК – в 1,12 раза в сравнении со значениями группы 5. В эритроцитарной массе крови содержание ДК уменьшилось в 1,26 раза, в сравнении со значениями 28-ого дня интоксикации пестицидом. В гомогенате печени содержание МДА уменьшилось в 1,17 раза, а ДК – в 1,14 раза, в сравнении с группой 5. В плазме, эритроцитарной массе крови и гомогенате печени полученные изменения статистически не значимы по сравнению с 28 днем интоксикации, за исключением содержания МДА в эритроцитарной массе ($p < 0,001$).

3.3. Показатели антиоксидантной системы в условиях пестицидной интоксикации и коррекции витамином Е

В результате проведенной серии экспериментов по изучению количественной характеристики основных показателей

антиоксидантной системы крови и гомогената печени крыс в условиях субхронической интоксикации пестицидным препаратом тирам и коррекции витамином Е получены и представлены (таблица 3.7, 3.8, 3.9) следующие данные.

Таблица 3.7 – Влияние коррекции витамином Е на показатели антиоксидантной защиты организма в плазме крови после экспериментальной интоксикации тирамом

Показатель	M±m		
	Группа 1	Группа 5	Группа 7
	Контроль (интактные)	Интоксикация Тирамом 28 сутки	Интоксикация Тирамом+ Витамин Е
ROS, мкмоль/л	0,26±0,02	0,85±0,08	0,28±0,02 ^{xxx}
ОАА, ммоль/л	66,43±8,06	40,29±4,18	66,37±7,04 ^x
GSH, мкг/мл	148,43±14,16	56,33±6,90	153,07±15,10 ^{xxx}
GSSG, мкг/мл	0,69±0,06	2,28±0,22	0,45±0,04 ^{xxx}
GST, мЕд/мл	0,41±0,04	0,71±0,07	0,43±0,04 ^{xx}
GPx, мЕд/мл	40,12±4,75	56,98±5,44	30,31±3,46 ^x
GSR, мЕд/мл	4,75±0,53	12,64±1,24	3,80±0,37 ^{xxx}
КАТ, мкат/л	11,99±1,24	6,82±0,80	12,21±1,18 ^{xx}
СОД, у.е.	17,12±1,72	12,11±1,24	18,99±2,06 ^x
МДА, моль/л	1,12±0,16	2,80±0,28	1,15±0,11 ^{xxx}
ДК, мкмоль/л	0,27±0,03	0,72±0,10	0,24±0,03 ^{xxx}

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», *** – $p < 0,001$ по сравнению с группой «контроль (интактные)»; ^x – $p < 0,05$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{xx} – $p < 0,01$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{xxx} – $p < 0,001$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

Таблица 3.8 – Влияние коррекции витамином Е на показатели антиоксидантной защиты организма в эритроцитарной массе крови после экспериментальной интоксикации тирамом

Показатель	M±m		
	Группа 1	Группа 5	Группа 7
	Контроль (интактные)	Интоксикация Тирамом 28 сутки	Интоксикация Тирамом+ Витамин Е
ROS, мкмоль/л	115,24±12,04	164,38±16,48	105,44±10,62 ^x
GSH, мкг/мл	575,16±58,99	152,49±15,63	583,33±59,33 ^{xxx}

GSSG, мкг/мл	5,24±0,54	9,15±0,94	4,31±0,49 ^{XX}
GST, мЕд/мл	0,17±0,01	0,40±0,04	0,22±0,03 ^{XXX}
GPx, мЕд/мл	90,29±9,02	125,44±12,66	85,15±9,34 ^X
GSR, мЕд/мл	4,96±0,49	15,76±1,76	6,08±0,69 ^{XXX}
КАТ, ммоль/мин*гНб	7,10±0,86	3,11±0,35	7,30±0,74 ^{XXX}
СОД, ммоль/мин*гНб	6,34±0,68	3,92±0,40	6,21±0,68 ^X
МДА, нмоль/гНб	0,24±0,03	1,86±0,18	0,29±0,04 ^{XXX}
ДК, усл. ед./мг белка	0,06±0,00	0,24±0,03	0,06±0,00 ^{XXX}

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», *** – $p < 0,001$ по сравнению с группой «контроль (интактные)»; ^X – $p < 0,05$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{XX} – $p < 0,01$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{XXX} – $p < 0,001$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

Таблица 3.9 – Влияние коррекции витамином Е на показатели антиоксидантной защиты организма в гомогенате печени после экспериментальной интоксикации тирамом

Показатель	M±m		
	Группа 1	Группа 5	Группа 7
	Контроль (интактные)	Интоксикация Тирамом 28 сутки	Интоксикация Тирамом+ Витамин Е
ROS, мкмоль/л	149,64±15,24	212,18±21,53	98,91±10,47 ^{XXX}
GSH, мкг/мл	850,72±89,06	447,22±47,83	1519,24±206,55 ^{XXX}
GSSG, мкг/мл	6,27±0,64	15,17±1,61	7,85±0,79 ^{XX}
GST, мЕд/мл	2,15±0,23	6,15±0,73	1,72±0,18 ^{XXX}
GPx, мЕд/мл	4,25±0,50	6,75±0,68	3,51±0,39 ^X
GSR, мЕд/мл	8,34±0,84	17,41±1,86	7,02±0,71 ^{XXX}
КАТ, мкмоль/г	7,28±0,84	3,16±0,40	7,39±0,81 ^{XXX}
СОД, ед/мг	12,13±1,26	5,01±0,59	11,98±1,28 ^{XXX}
МДА, нмоль/мл	0,98±0,13	1,92±0,20	1,15±0,16 ^X
ДК, ед. оптич. плотности/мг	0,19±0,02	0,94±0,14	0,26±0,03 ^{XXX}

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», *** – $p < 0,001$ по сравнению с группой «контроль (интактные)»; ^X – $p < 0,05$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{XX} – $p < 0,01$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{XXX} – $p < 0,001$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

данные, полученные при применении витамина E, после проведения экспериментальной интоксикации тирамом (группа 7) сравнивали с контролем (группа 1) и со значениями, полученными на 28 день интоксикации (группа 5).

При применении, в качестве антиоксиданта, витамина E, содержание ROS уменьшилось в 3,03 раза ($p < 0,001$), в плазме; в 1,66 раза ($p < 0,05$), в эритроцитарной массе крови и в 2,14 раза ($p < 0,001$), в гомогенате печени лабораторных животных, в сравнении со значениями 28-ого дня интоксикации тирамом. Контрольные значения содержания ROS были восстановлены во всех анализируемых средах.

Применение витамина E привело к увеличению значения ОАА в 1,64 раза ($p < 0,05$), в сравнении с группой 5 и достигло уровня контрольных значений.

Применение витамина E, после проведения экспериментальной субхронической интоксикации, привело к значительному восстановлению содержания восстановленного и окисленного глутатиона во всех анализируемых образцах. В группе 7 содержание GSH увеличилось в 2,71 раза ($p < 0,001$), в плазме крови; в 3,82 раза ($p < 0,001$) в эритроцитарной массе крови и в 3,39 раза ($p < 0,001$), в гомогенате печени крыс, в сравнении со значениями группы 5. Во всех исследуемых образцах были достигнуты контрольные значения. Содержание GSSG, при использовании витамина E, уменьшилось в 5,06 раза ($p < 0,001$), в плазме крови; в 2,12 раза ($p < 0,01$), в эритроцитарной массе крови и в 1,93 раза ($p < 0,01$) в гомогенате печени, в сравнении со значениями группы 5. Уровень контрольных значений был достигнут во всех исследуемых средах.

Витамин E оказал значительный восстановительный эффект на активность GST, достигнув значений контрольной группы. В группе 7 наблюдалось снижение исследуемого показателя: в плазме крови – в 1,65 раза ($p < 0,01$), в эритроцитарной массе крови - в 1,81 раза ($p < 0,001$) и в гомогенате печени – в 3,57 раза ($p < 0,001$), в сравнении со значениями группы 5.

Применение витамина E, привело к снижению активности GPx в 1,88 раза ($p < 0,05$), в плазме крови; в 1,47 раза, в эритроцитарной массе крови ($p < 0,05$) и в 1,92 раза ($p < 0,05$), в гомогенате печени крыс, в сравнении со значениями группы

5. Контрольные значения показателя были достигнуты во всех исследуемых образцах.

В 7 группе активность глутатионредуктазы снизилась в 3,32 раза ($p < 0,001$), в плазме крови; в 2,59 раза ($p < 0,001$), в эритроцитарной массе крови и в 2,48 раза ($p < 0,001$), в гомогенате печени крыс, в сравнении со значениями 28-ого дня интоксикации. Контрольные значения активности GSR были достигнуты во всех исследуемых средах.

В 7 группе активность КАТ увеличилась в 1,79 раза ($p < 0,01$), в плазме крови; в 2,34 раза ($p < 0,001$) в эритроцитарной массе крови и в 2,33 раза ($p < 0,001$), в гомогенате печени крыс, в сравнении со значениями группы 5. Во всех исследуемых образцах были достигнуты контрольные значения. Активность СОД в анализируемой группе увеличилась в 1,56 раза, в плазме крови; в 1,58 раза, в эритроцитаной массе крови и в 2,39 раза в гомогенате печени, в сравнении со значениями группы 5. Уровень контрольных значений был достигнут во всех исследуемых средах.

Использование витамина Е, привело к уменьшению содержания МДА в 2,43 раза ($p < 0,001$), в плазме крови; в 6,41 раза ($p < 0,001$) в эритроцитарной массе крови и в 1,67 раза ($p < 0,05$), в гомогенате печени крыс, в сравнении со значениями группы 5. Во всех исследованных образцах не были достигнуты контрольные значения. Содержание ДК в группе 7 уменьшилось в 3,00 раза ($p < 0,001$), в плазме крови; в 4,00 раза ($p < 0,001$), в эритроцитаной массе крови и в 3,61 раза ($p < 0,001$) в гомогенате печени, в сравнении со значениями группы 5. Уровень контрольных значений был достигнут в плазме, эритроцитаной массе крови и гомогенате печени животных.

3.4. Показатели антиоксидантной системы в условиях пестицидной интоксикации и коррекции расторопшей

В результате проведенной серии экспериментов по изучению количественной характеристики основных показателей антиоксидантной системы крови и гомогената печени крыс в условиях субхронической интоксикации

пестицидным препаратом тирам и коррекции расторопшей получены и представлены (таблица 3.10, 3.11, 3.12) следующие данные.

Таблица 3.10 – Влияние коррекции расторопшей на показатели антиоксидантной защиты организма в плазме крови после экспериментальной интоксикации тирамом

Показатель	M±m		
	Группа 1	Группа 5	Группа 8
	Контроль (интактные)	Интоксикация Тирамом 28 сутки	Интоксикация Тирамом+ Расторопша
ROS, мкмоль/л	0,26±0,02	0,85±0,08	0,30±0,03 ^{xxx}
ОАА, ммоль/л	66,43±8,06	40,29±4,18	64,30±7,2 ^x
GSH, мкг/мл	148,43±14,16	56,33±6,90	136,82±13,51 ^{xxx}
GSSG, мкг/мл	0,69±0,06	2,28±0,22	0,74±0,07 ^{xxx}
GST, мЕд/мл	0,41±0,04	0,71±0,07	0,51±0,05 ^x
GPx, мЕд/мл	40,12±4,75	56,98±5,44	45,29±4,92
GSR, мЕд/мл	4,75±0,53	12,64±1,24	5,81±0,60 ^{xxx}
КАТ, мкат/л	11,99±1,24	6,82±0,80	11,13±1,14 ^x
СОД, у.е.	17,12±1,72	12,11±1,24	17,28±1,97 ^x
МДА, моль/л	1,12±0,16	2,80±0,28	1,70±0,21 ^x
ДК, мкмоль/л	0,27±0,03	0,72±0,10	0,28±0,03 ^{xxx}

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», *** – $p < 0,001$ по сравнению с группой «контроль (интактные)»; ^x – $p < 0,05$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{xx} – $p < 0,01$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{xxx} – $p < 0,001$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

Таблица 3.11 – Влияние коррекции расторопшей на показатели антиоксидантной защиты организма в эритроцитарной массе крови после экспериментальной интоксикации тирамом

Показатель	M±m		
	Группа 1	Группа 5	Группа 8
	Контроль (интактные)	Интоксикация Тирамом 28 сутки	Интоксикация Тирамом+ Расторопша
ROS, мкмоль/л	115,24±12,04	164,38±16,48	115,97±11,85 ^x
GSH, мкг/мл	575,16±58,99	152,49±15,63	568,56±56,58 ^{xxx}

GSSG, мкг/мл	5,24±0,54	9,15±0,94	5,37±0,56 ^X
GST, мЕд/мл	0,17±0,01	0,40±0,04	0,24±0,02 ^{XXX}
GPx, мЕд/мл	90,29±9,02	125,44±12,66	99,25±10,43
GSR, мЕд/мл	4,96±0,49	15,76±1,76	7,38±0,73 ^{XXX}
КАТ, ммоль/мин*гНб	7,10±0,86	3,11±0,35	5,39±0,68 ^X
СОД, ммоль/мин*гНб	6,34±0,68	3,92±0,40	5,69±0,61 ^X
МДА, нмоль/гНб	0,24±0,03	1,86±0,18	0,32±0,04 ^{XXX}
ДК, усл. ед./мг белка	0,06±0,00	0,24±0,03	0,11±0,01 ^{XXX}

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», *** – $p < 0,001$ по сравнению с группой «контроль (интактные)»; ^X – $p < 0,05$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{XX} – $p < 0,01$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{XXX} – $p < 0,001$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

Таблица 3.12 – Влияние коррекции расторопшей на показатели антиоксидантной защиты организма в гомогенате печени после экспериментальной интоксикации тирамом

Показатель	M±m		
	Группа 1	Группа 5	Группа 8
	Контроль (интактные)	Интоксикация Тирамом 28 сутки	Интоксикация Тирамом+ Расторопша
ROS, мкмоль/л	149,64±15,24	212,18±21,53	123,98±12,64 ^X
GSH, мкг/мл	850,72±89,06	447,22±47,83	1036,01±141,17 ^{XX}
GSSG, мкг/мл	6,27±0,64	15,17±1,61	9,53±1,02 ^X
GST, мЕд/мл	2,15±0,23	6,15±0,73	2,30±0,25 ^{XXX}
GPx, мЕд/мл	4,25±0,50	6,75±0,68	4,31±0,45 ^X
GSR, мЕд/мл	8,34±0,84	17,41±1,86	9,77±1,03 ^{XX}
КАТ, мкмоль/г	7,28±0,84	3,16±0,40	6,94±0,82 ^{XX}
СОД, ед/мг	12,13±1,26	5,01±0,59	10,72±1,10 ^{XX}
МДА, нмоль/мл	0,98±0,13	1,92±0,20	1,21±0,13 ^X
ДК, ед. оптич. плотности/мг	0,19±0,02	0,94±0,14	0,30±0,04 ^{XXX}

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой «контроль (интактные)», *** – $p < 0,001$ по сравнению с группой «контроль (интактные)»; ^X – $p < 0,05$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{XX} – $p < 0,01$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», ^{XXX} – $p < 0,001$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

Все данные, полученные при применении расторопши, после проведения экспериментальной интоксикации тирамом (группа 8) сравнивали с контролем (группа 1) и со значениями, полученными на 28 день интоксикации (группа 5).

При применении расторопши, содержание восстановленного глутатиона увеличилось в 2,42 раза ($p < 0,001$) в плазме крови; в 3,72 раза ($p < 0,001$), в эритроцитарной массе крови и в 2,31 раза ($p < 0,01$), в гомогенате печени животных, в сравнении со значениями 28-ого дня интоксикации тирамом. Контрольные значения восстановленного глутатиона были достигнуты во всех исследуемых средах. В группе 8 значение содержания GSSG уменьшилось в 3,08 раза ($p < 0,001$), в плазме крови; в 1,70 раза ($p < 0,05$), в эритроцитарной массе крови и в 1,59 раза ($p < 0,05$), в сравнении со значениями 28-ого дня интоксикации тирамом. Контрольные значения содержания окисленного глутатиона достигнуты во всех исследуемых образцах.

Применение расторопши привело к снижению активности GSR в 2,17 раза ($p < 0,001$), в плазме крови; в 2,13 раза ($p < 0,001$), в эритроцитарной массе крови и в 1,78 раза ($p < 0,01$), в гомогенате печени животных, в сравнении с группой 5. В проанализированных образцах значения достигли уровня контрольной группы 1.

В 8 группе активность GPx снизилась в 1,25 раза, в плазме крови; в 1,26 раза, в эритроцитарной массе крови и в 1,56 раза ($p < 0,01$), в гомогенате печени, в сравнении с 28-м днем интоксикации тирамом. Во всех образцах активность GPX соответствует значениям контрольной группы.

Использование расторопши повлекло за собой снижение активности GST в 1,39 раза, в плазме крови; в 1,66 раза ($p < 0,01$), в эритроцитарной массе крови и в 2,67 раза ($p < 0,001$), в гомогенате печени крыс, в сравнении с 28-ым днем интоксикации пестицидом. Контрольные значения были достигнуты.

Уменьшение содержания ROS было отмечено в группе 8: в 2,83 раза ($p < 0,001$), в плазме; в 1,41 раза ($p < 0,05$) в эритроцитарной массе крови и в 1,71 раза ($p < 0,05$), в гомогенате печени лабораторных животных, в сравнении со

значениями группы 5. Содержание ROS восстановилось до контрольных значений.

Выбранный антиоксидант привел к увеличению значения ОАА в 1,59 раза ($p < 0,05$), в сравнении с 28-м днем интоксикации, достигнув уровня контрольной группы 1. В группе 8 отмечено увеличение активности КАТ в 1,63 раза ($p < 0,05$) в плазме крови; в 1,73 раза ($p < 0,05$), в эритроцитарной массе крови и в 2,19 раза ($p < 0,01$), в гомогенате печени животных, в сравнении со значениями 28-ого дня интоксикации тирамом. Контрольные значения активности каталазы были достигнуты во всех исследуемых образцах. Активность СОД в данной группе увеличилась в 1,42 раза ($p < 0,05$), в плазме крови; в 1,45 раза ($p < 0,05$), в эритроцитарной массе крови и в 2,14 раза ($p < 0,01$), в сравнении со значениями 28-ого дня интоксикации тирамом. Контрольные значения активности СОД были достигнуты во всех образцах крыс.

В группе 8, выбранный антиоксидантный препарат привел к уменьшению содержания МДА в 1,64 раза ($p < 0,05$) в плазме крови; в 5,81 раза ($p < 0,001$), в эритроцитарной массе крови и в 1,58 раза ($p < 0,05$), в гомогенате печени животных, в сравнении со значениями 28-ого дня интоксикации тирамом. Контрольные значения малонового диальдегида были достигнуты во всех исследованных образцах. Содержание ДК уменьшилось в 2,57 раза ($p < 0,001$), в плазме крови; в 2,18 раза ($p < 0,001$), в эритроцитарной массе крови и в 3,13 раза ($p < 0,001$), в сравнении со значениями 28-ого дня интоксикации тирамом. Контрольные значения содержания ДК достигнуты были во всех исследуемых образцов.

3.5. Экологически сбалансированный рацион питания с включением растительной продукции, содержащей антиоксиданты

При окислительном стрессе организм не всегда способен контролировать прооксидантно-антиоксидантный гомеостаз и поэтому для его коррекции используют антиоксиданты, в большинстве случаев растительной природы, которые эффективно снижают содержание ключевых маркеров окислительного

стресса [10; 186]. В последнее время уделяется большое внимание использованию экологически чистого сбалансированного питания, с включением в рацион растительных продуктов с высоким содержанием веществ с антиоксидантными свойствами [48; 171; 210].

В нашей работе показаны высокие антиоксидантные свойства витамина Е при коррекции последствий, вызванных окислительным стрессом. Поэтому нами проанализированы продукты питания, содержащие в своем составе данный антиоксидант, которые могут включаться в рацион питания работников сфер АПК и производств агрохимикатов. Суточная доза витамина Е для человека не должна превышать 15 мг [12] (табл. 3.13).

Таблица 3.13 – Продукты, содержащие витамин Е

Продукты	Мг на 100 г	Суточная доза (грамм)
1. Подсолнечное масло	67	22,38
2. Шпинат	35	42,85
3. Маргарин	25	60,00
4. Проросшие зерна пшеницы	25	60,00
5. Брокколи	15	100,00
6. Цельнозерновой хлеб	15	100,00
7. Облепиха	10,3	145,63
8. Кукуруза	10	150,00
9. Гречневая крупа	6,65	225,56
10. Горох	2,6	546,92
11. Яйца куриные	2	750,00
12. Семена подсолнечника	0,035	42857,14

Максимальное содержание исследуемого антиоксиданта отмечено в подсолнечном масле. Для восполнения суточной дозы витамина Е необходимо употреблять не более 22,38 г (или 22,38 мл) в день. Растительное масло можно использовать в качестве заправки различных салатов [86].

На втором месте по содержанию витамина Е стоит шпинат. Доза потребления молодых листьев овоща не должна превышать 42,85 г. Можно использовать как свежий, так и замороженный шпинат. В кулинарии выделяют множество блюд, основным ингредиентом которых будет служить данный листовый овощ. Например, супы, запеканки, смузи и другие. Однако людям, страдающим мочекаменной болезнью и заболеваниями печени, желчного пузыря и двенадцатиперстной кишки, данный продукт противопоказан из-за высокого содержания щавелевой кислоты [103].

Маргарин является важной составляющей многих кулинарных и кондитерских изделий. Его суточная доза потребления не должна превышать 60 г [9].

Проросшие зерна пшеницы хорошо усваиваются организмом, обладают очищающими и восстанавливающими свойствами. Прорастить зерна можно самостоятельно в домашних условиях. Для этого пшеницу необходимо тщательно промыть под проточной водой и поместить в стеклянную посуду. Залить теплой водой так, чтобы зерна скрылись. Накрыть емкость чистой, мягкой тканью и оставить при комнатной температуре примерно на сутки. На следующий день зерна необходимо промыть водой, в глубокую тарелку расстелить влажную ткань и распределить по ней тонким слоем пшеницу. Сверху накрыть мокрой тканью. Через несколько часов зерна начнут прорастать и на семенах появятся беленькие ростки. Употреблять пророщенную пшеницу лучше с длиной ростков 1–2 мм, в это время в них содержится максимальное количество витаминов и микроэлементов. После того как зерна проросли, их нужно поместить в холодильник, хранить так можно 5–7 дней. Противопоказаний не имеет. Проростки пшеницы можно добавлять в овощные салаты, например, винегрет, салат с рукколой или морковью. Можно приготовить котлеты с ростками пшеницы, пирожные с сухофруктами, булочки и хлеб. Зерна можно перемолоть в кофемолке и добавлять полученную муку в супы, вторые блюда, готовить кашу или кисель. Суточная доза – не более 60 г [104; 161].

100 грамм брокколи содержит 15 мг витамина Е. Данный овощ следует употреблять сырым или приготовленным на пару. Следует помнить, что брокколи не должен соприкасаться с кипящей водой. Это может привести к снижению содержания витамина в продукте. Суточная доза - 100 г [108].

Цельнозерновой хлеб является основой пищевого рациона для многих людей. Стимулирует рост полезной микрофлоры кишечника, что влечет за собой усиление иммунного ответа. В день следует употреблять не более 100 г данного продукта [88].

Ягоды облепихи также богаты витамином Е, но не стоит употреблять их каждый день. Из-за высокого содержания витаминов в своем составе, чрезмерное употребление облепихи может привести к аллергическим реакциям. Перед употреблением следует проконсультироваться с врачом. В сутки следует принимать не более 145,63 г продукта. Это восполнит потребность организма в исследуемом нами антиоксиданте [116].

Употребление кукурузы и гороха приводит к улучшению состояния здоровья человека и укреплению иммунной системы. Данные продукты входят в состав детского питания и различных диет. Наибольшее содержание витамина Е отмечено в кукурузе – 10 мг на 100 г продукта, тогда как в горохе содержится 2,6 мг. Также отмечено, что консервированная кукуруза сохраняет практически все полезные свойства, что и свежий продукт [37].

Гречневая крупа относится к популярным зерновым и входит в перечень «социальных продуктов». Приготовить ее можно множеством способов, однако следует помнить о времени термической обработки продукта, для максимального сохранения полезного состава крупы. Не следует употреблять более 225,56 г гречки в сутки [10].

В куриных яйцах содержится не более 2 мг витамина Е (из расчета на 100 г продукта). Незначительная концентрация антиоксиданта отмечена в семенах подсолнечника, которые выращивают в Российской Федерации в большом количестве, поэтому данный продукт является доступным для людей и может входить в состав множества блюд [88].

Все описанные выше продукты могут быть использованы для составления, разнообразного сбалансированного меню, которое позволит человеку восполнить потребность в витаминах и микроэлементах, в том числе и в витамине Е [108; 152; 178].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время проблема циркуляции ксенобиотиков в экосистемах относится к разряду глобальных экологических проблем [69; 76]. В список потенциальных загрязнителей биосферы входят пестицидные препараты, являющиеся одним из основных факторов в повышении эффективности агропромышленного комплекса [88; 96; 123; 198]. Широкое повсеместное применение пестицидов, ассортимент которых ежегодно увеличивается, ставит вопрос об изучении характера и степени зависимости между изменениями функционирования живых организмов и загрязнением окружающей среды [97; 159; 174; 268]. Через воздух, с пищей и водой, а также через кожу и слизистые оболочки пестициды могут проникать в организм человека и приводить к развитию негативных последствий, которые сопровождаются нарушением структурно-метаболических и функциональных характеристик на клеточном уровне [24; 36; 134; 241]. Это отражается в изменении функционирования систем гомеостаза организма [81; 106; 199; 286].

В агропромышленном комплексе Российской Федерации особое место принадлежит группе фунгицидов, которые используются в значительных объемах. Широкое распространение получил фунгицидный препарат тирам (тетраметилтиурамдисульфид, ТМДТ). Токсикант относится к классу дитиокарбаматов и применяется в качестве контактного протравителя семян в борьбе с корневыми гнилями (гельминтоспориозная и фузариозная), плесневением семян, аскохитозом и антракозом [14]. Следует отметить, что тирам обладает выраженным кумулятивным действием и токсичен для теплокровных животных и человека. Поступление в течение длительного времени малых доз пестицида с продуктами питания может приводить к развитию хронического токсического окислительного стресса [168; 304]. Одним из важных патогенетических механизмов в данном аспекте выступает подавление антиоксидантной системы организма и активация процессов перекисного окисления липидов [7; 267; 299; 310].

Выполненный в работе комплекс исследований позволил изучить взаимосвязи между функционированием систем антиоксидантной защиты и процессами перекисного окисления липидов крыс в условиях субхронической интоксикации пестицидным препаратом тирам и коррекции антиоксидантными препаратами – витамином Е и расторопшей.

Эксперименты были выполнены на половозрелых крысах-самцах линии Вистар, которые обладают в сравнении с другими линиями, низкой стрессоустойчивостью и традиционно используются в работах по исследованию стрессиндуцированных изменений в организме [40; 81]. Было выбрано введение исследуемого препарата вместе со стандартным пищевым рационом для исключения иммобилизационного стрессорного воздействия на организм животных.

Вышесказанное объясняет цель исследования, поставленную в работе. **Целью работы** явилось изучение влияния фунгицида тирам на вариабельность отдельных показателей антиоксидантной защиты организма и процессов перекисного окисления липидов, а также способов коррекции антиоксидантного статуса препаратами витамином Е и расторопшей.

Начальным этапом работы стало изучение влияния субхронической интоксикации тирамом на концентрацию активных форм кислорода, а также функционирование глутатионового звена антиоксидантной защиты в плазме, эритроцитарной массе крови и гомогенате печени лабораторных животных. В ходе исследования было обнаружено увеличение содержания ROS во всех анализируемых средах, особенно в плазме крови (в 3,26 раза), что подтверждает развитие оксидативного стресса в организме изучаемых животных. Интенсивно образующиеся свободные радикалы и реактивные молекулы кислорода оказывают повреждающее действие на все типы биомолекул и способствуют тем самым формированию донозологических нарушений, увеличению уровня эндогенной интоксикации [62; 292].

На фоне увеличения содержания ROS нами зафиксировано значительное снижение восстановленного глутатиона во всех анализируемых средах на

протяжении всего периода интоксикации. Максимальное снижение в 3,77 раза было зафиксировано в эритроцитарной массе крови на 28-е сутки введения исследуемого фунгицида. Так как глутатион восстановленный является низкомолекулярным антиоксидантом и может выступать в качестве эффективного скэвенджера свободных радикалов, то полученные результаты свидетельствуют о нарушении работы ферментативного звена антиоксидантной системы в результате развития окислительного стресса.

Как следствие, снижение содержания GSH привело к увеличению содержания окисленного глутатиона. Это объясняется тем, что нехватка восстановленного глутатиона приводит к нарушению восстановления дисульфидной связи (S-S) в молекуле окисленного глутатиона и его переносу за пределы клеток. Увеличение содержания GSSG в 3,30 раза было зафиксировано в плазме крови на 28 день интоксикации по отношению к контролю.

Аналогичные результаты были получены исследователями при экспозиции тирамом в дозе 150 μM [304]. Повышенный уровень GSSG при интоксикации свидетельствует об истощении активности антиоксидантного барьера.

Вышеописанные нарушения работы системы антиоксидантной защиты сопровождаются дисбалансом ее ферментативного звена со снижением каталазной и супероксиддисмутазной активности [63; 108; 220]. Наибольшее снижение активности ферментов было отмечено на 28-й день интоксикации в гомогенате печени лабораторных животных: в 2,30 и 2,42 раза, по отношению к значениям контролю. В условиях избыточного образования свободных радикалов при субхронической интоксикации происходит подавление активности ферментов во всех анализируемых образцах в результате их активного потребления. Параллельно этому вследствие изменения кровотока в капиллярах нарушается поступление новых антиоксидантов [170]. Нами показано, что в печени, которая является органом-мишенью ксенобиотиков, под влиянием тирама наблюдается наиболее выраженное угнетение активности СОД, что, по-видимому, обусловлено её ингибированием при накоплении продуктов ПОЛ, а также возможными

структурными изменениями молекулы фермента, в частности, ее гликированием [183]. Супероксиддисмутаза ускоряет диспропорционирование супероксидных радикалов в O_2 и H_2O_2 с последующим их превращением в H_2O в пероксисомах. Этот процесс происходит при помощи каталазы [60]. Снижение активности СОД происходит также при применении других пестицидов, например хлорпирифоса в дозе $1/10 LD_{50}$. Уровень защиты клетки от окислительного стресса сильно варьирует в зависимости от активности и баланса данных исследуемых антиоксидантных ферментов [223].

Стоит отметить, что работа системы антиоксидантной защиты организма не была бы возможна, без ферментов глутатионового семейства – глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. Важно отметить, что глутатионтрансфераза катализирует конъюгацию глутатиона, глутатионредуктаза восстанавливает дисульфидную связь окисленного глутатиона GSSG до его сульфгидрильной формы GSH, а глутатионпероксидаза катализирует восстановление гидроперекисей липидов в соответствующие спирты и восстановление пероксида водорода до воды [230; 319]. При анализе данных ферментов нами было зафиксировано увеличение активности глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. Причем на 28 день интоксикации по отношению к контролю произошли максимальные изменения активности GST и GPx в гомогенате печени в 2,86 раза и в 2,09 раза, соответственно, а активности GSR – в эритроцитарной массе (в 3,17 раза). Это может быть сопряжено с активацией свободнорадикальных процессов в организме животных при применении фунгицида тирам и соответствующем росте степени мобилизации данных ферментов антиоксидантной защиты. Такие изменения ферментов метаболизма глутатиона могут свидетельствовать об дисбалансе данного звена, характеризующегося недостатком эффекторного энзима антирадикальной защиты.

Усиленное производство супероксидных радикалов при окислительном стрессе, может привести к процессам окисления белков и перекисному окислению

липидов, так как ОН радикал является высоко реактивной молекулой, которая может связывать и окислять липиды и белки [77; 214]. Нами было установлено, что у животных после экспериментальной субхронической интоксикации тирамом отмечаются существенные нарушения липидного профиля. Это отражается в увеличении концентрации продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида и диеновых конъюгатов) во всех исследованных биологических средах организма. При анализе эритроцитарной массы крови было зафиксировано максимальное увеличение исследуемых показателей: в 7,75 раза и в 4,00 раза, соответственно, по отношению к контролю на 28 день интоксикации.

Для оценки состояния эндогенной системы антиоксидантной защиты была определена общая антиоксидантная активность. Оценка ОАА плазмы крови, показала ее снижение в 1,64 раза при субхронической интоксикации.

Вторым этапом нашей работы был анализ полученных результатов после перехода животных на стандартный пищевой рацион по окончании интоксикации тирамом. Отмечено восстановление значений всех исследуемых показателей, однако выявленные изменения находились ниже уровня статистической значимости, за исключением уровня МДА в эритроцитарной массе крови. Максимальное увеличение количества восстановленного глутатиона было зафиксировано в эритроцитарной массе крови – в 2,10 раза, а снижение окисленного глутатиона в гомогенате печени – в 1,32 раза, по отношению 28 дню интоксикации.

После перехода на стандартный пищевой рацион значительно снизилось содержание ROS в плазме крови животных – в 1,32 раза, по отношению к 28-му дню интоксикации. Общая антиоксидантная активность крови увеличилась в 1,20 раза. Максимальное увеличение активности каталазы и супероксиддисмутазы произошло в гомогенате печени крыс: 1,36 раза и в 1,42 раза, соответственно, по отношению к 28 дню интоксикации. Активность глутатионтрансферазы и глутатионпероксидазы максимально снизилась в гомогенате печени животных после перехода на стандартный пищевой рацион: в 1,40 раза и в 1,17 раза,

соответственно, а глутатионредуктазы в эритроцитарной массе крови – в 1,25 раза. Снижение количества продуктов перекисного окисления липидов – МДА и ДК зафиксировано в эритроцитарной массе крови: в 1,47 раза и в 1,26 раза, соответственно.

Однако переход к стандартному пищевому рациону не привел к достижению контрольных значений. Поэтому нами в работе были применены для коррекции метаболических нарушений растительные антиоксидантные препараты – витамин Е и расторопша, которые обладают способностью ингибировать процессы образования свободных радикалов и препятствовать перекисному окислению липидов мембран.

При добавлении к рациону витамина Е приводит увеличение GSH в 3,82 раза в эритроцитарной массе крови и снижение содержания GSSG и ROS в плазме: в 5,06 раза и 3,03 раза, соответственно, по отношению к значениям 28-го дня интоксикации. Значение ОАА увеличилось в 1,64 раза. Активность каталазы значительно увеличилась в эритроцитарной массе крови – в 2,34 раза, а супероксиддисмутазы в гомогенате печени крыс – в 2,39 раза. В гомогенате печени было зафиксировано максимальное снижение активности глутатионтрансферазы и глутатионпероксидазы – в 3,57 раза и в 1,92 раза, соответственно, а активность глутатионредуктазы – в плазме крови (в 3,32 раза). В эритроцитарной массе крови отмечено значительное снижение содержания МДА и ДК – в 6,41 раза и в 4,00 раза, соответственно.

Добавление в рацион расторопши приводит к максимальному увеличению концентрации восстановленного глутатиона в эритроцитарной массе крови – в 3,72 раза, в сравнении с 28 днем интоксикации. Содержание окисленного глутатиона и реактивных форм кислорода снизилось – в плазме крови (в 3,08 раза и в 2,83 раза, соответственно). Общая антиоксидантная активность крови изменилась при применении расторопши в 1,59 раза в сравнении с 28-м днем интоксикации. Изменения активности ферментов каталазы и супероксиддисмутазы в 2,19 раза и в 2,14 раза, соответственно, зафиксированы в гомогенате печени крыс. Активность GST и GPx значительно восстановилась в

гомогенате печени животных – в 2,67 раза и в 1,56 раза, соответственно. Активность GSR увеличилась в плазме крови в 2,17 раза. Уменьшение содержания малонового диальдегида отмечено в эритроцитарной массе крови (в 5,81 раза), а диеновых конъюгатов – в гомогенате печени (в 3,13 раза).

Применение витамина Е и расторопши оказывает восстановительный эффект на показатели функционирования системы антиоксидантной защиты. Полученные результаты позволяют рекомендовать витамин Е и расторопшу в качестве средств коррекции окислительного стресса при действии ксенобиотиков [46; 144; 157; 167; 206].

Таким образом, полученные результаты позволили выделить несколько особенностей нарушений функционирования антиоксидантной системы защиты организма и процессов перекисного окисления липидов у крыс, подвергшихся субхронической интоксикации пестицидным препаратом тирам на фоне развивающегося оксидативного стресса. Нами было установлено, что формирование и накопление активных форм кислорода сопровождается выраженными проявлениями дисбаланса прооксидантно-антиоксидантной системы организма. Были зарегистрированы более низкие значения концентрации глутатиона, общей антиоксидантной активности, более высокий уровень содержания продуктов ПОЛ, а также более выраженные проявления дисбаланса ферментного звена системы антиоксидантной защиты. Зафиксировано, что большинство проанализированных нами маркеров окислительного стресса незначительно изменились после перехода к стандартному пищевому рациону, однако эти изменения не привели к восстановлению значений изучаемых показателей, до уровня контроля. На основании этого были применены препараты антиоксидантной направленности действия: витамин Е и расторопша. Эффективность коррекции подтверждена полученными результатами. Применение данных препаратов позволяет обеспечить нормализацию прооксидантно-антиоксидантного баланса во всех анализируемых средах, что важно для дальнейшего их внедрения в состав антиоксидантной терапии

экозависимых патологий, для ликвидации последствий окислительного стресса, или в качестве профилактического средства.

ВЫВОДЫ

1. При субхронической интоксикации фунгицидом тирам в организме крыс происходило формирование окислительного стресса, что выражалось в избыточной генерации реактивных форм кислорода, при этом максимальные изменения были зафиксированы на 28 день интоксикации. Содержание ROS увеличилось в печени в 1,41 раза, в плазме – в 3,26 раза, в эритроцитаной массе крови – в 1,42 раза. При этом общая антиоксидантная активность крови снизилась в 1,64 раза.

2. При длительном поступлении фунгицида в организм крыс наблюдались изменения в функционировании системы глутатиона, что выражалось в снижении содержания восстановленного и увеличении окисленного глутатиона. Значительное снижение восстановленного глутатиона было зафиксировано в эритроцитарной массе крови – в 3,77 раза. Максимальное увеличение окисленного глутатиона отмечено в плазме крови – в 3,30 раза.

3. Активность ферментов глутатионового семейства (глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы) характеризовалась увеличением исследуемых показателей, что являлось следствием активации антиокислительной защиты на фоне введения пестицидного препарата тирам.

4. При пестицидной экспозиции ферментативная активность супероксиддисмутазы и каталазы в ткани печени, плазме и эритроцитаной массе крови снижалась. При этом наиболее лабильным к действию фунгицида являлся фермент каталаза.

5. Усиление свободнорадикального окисления на фоне экологического стресса сопровождалось активацией процессов перекисного окисления липидов. Это выражалось в увеличении содержания малонового диальдегида и диеновых конъюгатов во всех анализируемых образцах. При этом на 28 день интоксикации значительные изменения были зафиксированы в эритроцитаной массе крови. Было отмечено увеличение содержания МДА в 7,75, а для ДК в 4,00 раза.

6. Введение антиоксиданта витамина Е на фоне субхронической интоксикации тирамом способствовало коррекции индуцированных сдвигов в работе системы антиоксидантной защиты. При этом отмечено восстановление показателей системы глутатиона, снижение концентрации реактивных форм кислорода, а также продуктов перекисного окисления липидов во всех исследуемых средах.

7. Восстановительный эффект был отмечен при применении экстракта расторопши после пестицидной интоксикации, при этом все исследуемые показатели во всех проанализированных средах достигли контрольных значений.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендовать врачам лечебно-профилактических учреждений, работающим в зоне активного применения пестицида тирам, уделять большее внимание обследованию работников агропромышленного сектора сельского хозяйства.
2. Коррекция выраженности антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов, вызванного фунгицидом тирам, может осуществляться с использованием растительных антиоксидантов витамином Е и расторопшей (с профилактической целью).
3. Мероприятия по совершенствованию подготовки кадров в ВУЗах: использовать в учебно-образовательной программе данные научной работы в виде научно-методических рекомендаций по изучению вариабельности антиоксидантной системы и липидного обмена в условиях острых и хронических пестицидных интоксикаций, в процессе изучения дисциплин «Генетика, медицинская экология», «Патологическая физиология», «Фармакология», «Биохимия».

Список сокращений

АОЗ – антиоксидантная система защиты

АПК – агропромышленный комплекс

АФК – активные формы кислорода

ГТ, GST – глутатионтрансфераза

ГП, GPx – глутатионпероксидаза

ГР, GSR – глутатионредуктаза

ДК – диеновые конъюгаты

КАТ – каталаза

МДА – малоновый диальдегид

ОАА – общая антиоксидантная активность

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СОД – супероксиддисмутаза

СР – свободные радикалы

GSH – глутатион восстановленный

GSSG – глутатион окисленный

HRP – пероксидаза хрена

ROS – реактивные формы кислорода

Список используемой литературы

1. Абрамченко, В.В. Антиоксиданты и антигипоксанты в акушерстве / В.В. Абрамченко. – СПб. : ДЕАН, 2001. – 400 с.
2. Антиокислительный гомеостаз человека: методы изучения, критерии оценки (обзор литературы) / И.Н. Попов, Г. Левин, А.К. Аносов [и др.] // Вестник РГМУ. – 2013. – № 2. – С. 69.
3. Антиоксидантная активность сыворотки крови / Г.И. Клебанов, Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 1999. – Т. 99, № 2. – С. 15–22.
4. Антиоксидантная терапия эндотелиальной дисфункции / И.Н. Тюренок, А.В. Воронков, А.А. Слиецанс [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2013. – Т. 11, № 1. – С. 14–25.
5. Антонов, О.В. Проблемы изучения экологической ситуации как фактора риска дисэмбриогенеза / О.В. Антонов // Экология человека. - 2007. N 8. – С.23-26.
6. Антонович, Е.А. Качество продуктов питания в условиях химизации сельского хозяйства / Е.А. Антонович, Л.К. Седокур.. – Киев : Урожай, 1990. – 239 с.
7. Арчаков, А.И. Микросомальное окисление / А.И. Арчаков. – М. : Наука, 1975. – 327 с.
8. Афанасьева, Г.А. О роли активации липопероксидации в патогенезе экспериментальной чумной интоксикации / Г.А. Афанасьева, И.П. Чеснокова // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2011. – № 1. – С. 46-48.
9. Балаболкин, М.И. Значение витаминов и микронуриентов в поддержании компенсации углеводного обмена у больных сахарным диабетом / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова, В.М. Креминская // Клиническая эндокринология. – 2007. – № 1. – С. 3–12.
10. Басов, А.А. Изменение антиоксидантного потенциала крови экспериментальных животных при нутриционной коррекции

- окислительного стресса / А.А. Басов, И.М. Быков // Вопросы питания. – 2013. – Т. 82, № 6. – С. 75–81.
- 11.Безель, В.С. Популяционная экотоксикология / В.С. Безель, В.Н. Большаков, Е.Л. Воробейчик. - М.: Наука, 1994. - 80с.
- 12.Безопасное использование пестицидов в условиях интенсификации сельского хозяйства / Е.А. Антонович, А.В. Болотный, В.С. Бурый и др. – Киев, 1988. – 248 с.
- 13.Безопасность труда при применении пестицидов в сельском хозяйстве / А.В. Ильницкая, И.В. Березняк, Л.И. Липкина, С.Г. Федорова // Безопасность жизнедеятельности. – 2006. - №1. – С.17-23.
- 14.Белов, Д.А. Химические методы и средства защиты растений в лесном хозяйстве и озеленении : учебное пособие для студентов / Д.А. Белов. – Москва : Изд-во Моск. гос. ун-та леса, 2003. – 128 с.
- 15.Беляев, Е.Н. Стойкие органические загрязнители, содержащиеся в окружающей среде, их влияние на здоровье населения / Е.Н. Беляев // Экологический вестник России. – 2002. – № 8. – С. 10–15.
- 16.Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии / отв. ред. А.И. Журавлев. – М.: Наука, 1982. – 240 с.
- 17.Биологические основы сельского хозяйства / под ред. И.М. Ващенко. – М: Академия, 2004. – 539 с.
- 18.Биохимия / Ф.Н. Гильмиярова [и др.] ; под ред. Ф.Н. Гильмияровой. – 4-е изд., перераб. и доп. – Самара : Офорт, 2015. – 365 с.
- 19.Биохимия : учебник / под ред. Е.С. Северина. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 779 с.
- 20.Биохимия человека : в 2 т. / Р. Марри [и др.] ; под ред. Л.М. Гинопмана ; пер. с англ. В.В. Борисова, Е.В. Дайниченко. – М. : Мир, 2004. – Т.1. – 381с.
- 21.Биохимия человека : в 2 т. / Р. Марри [и др.] ; под ред. Л.М. Гинопмана, В.И. Кандрора ; пер. с англ. М.Д. Гроздовой [и др.]. – М. : Мир, 2004. – Т. 2. – 414 с.

22. Богуславская, Н.В. Применять пестициды с учетом экологической безопасности (Белоруссия) / Н.В. Богуславская // Экологическая безопасность в АПК. Реферативный журнал. – 2011. – № 2. – С. 418.
23. Большой практикум : учебно-методическое пособие по самостоятельной работе. Раздел «Свободнорадикальные процессы в биологических системах» / сост. Н.М. Титова, Т.Н. Субботина. – Красноярск : Сиб. федер. ун-т, 2012. – 20 с.
24. Брызгунова, С.С. Оценка токсикологического влияния пестицидов на организм человека / С.С. Брызгунова, М.В. Еремина // Успехи современного естествознания. – 2011. – № 8. – С. 95–96.
25. Бурлакова, Е.Б. Модуляция перекисного окисления липидов биогенными аминами в модельных системах / Е.Б. Бурлакова, А.Е. Губарева // Вопросы мед. химии. – 1992. – Т. 38, № 2. – С. 17-20.
26. Васьковский, В.Е. Липиды / В.Е. Васьковский // Соросовский образов. журн. – 1997. – № 3. – С. 32-33.
27. Величковский, Б. Т. Свободнорадикальное окисление как звено срочной и долговременной адаптации организма к факторам окружающей среды / Б.Т. Величковский // Вестник Российской Академии медицинских наук. – 2001. – № 6. – С. 45–53.
28. Владимиров, Ю.А. Биологические мембраны и незапрограммированная смерть клетки / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 9. – С. 2–9.
29. Владимиров, Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М. : Наука, 1972. – 252 с.
30. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 13–19.
31. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю.А. Владимиров // Вестн. РАМН. – 1998. – № 7. – С. 43-51.

32. Влияние ксенона на состав и перекисное окисление липидов в головном мозге мышей / И.А. Хлусов [и др.] // Бюл. СО РАМН. – 2003. – № 4. – С. 42-47.
33. Влияние оксиметилурацила на перекисное окисление липидов и функционально-метаболические показатели печени при интоксикации старых крыс тетрахлорметаном / В.Н. Чернов [и др.] // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2007. – № 4. – С. 29-30.
34. Воробейчик, Е.Л. Экологическое нормирование техногенных загрязнений наземных экосистем (локальный уровень) / Е.Л. Воробейчик, О.Ф. Садыков, М.Г. Фарафонов - Екатеринбург: УИФ "Наука", 1994. -280с.
35. Воскресенский, О.Н. Антиоксидантная система, онтогенез и старение / О.Н. Воскресенский, И.А. Жутаев // Вопр. мед. химии. –1994. – № 3. – С. 53-56.
36. Выраженность эндогенной интоксикации и окислительного стресса в крови работников, контактирующих с производными глицина / Д.И. Мирошникова, В.А. Кирюшин, Н.И. Прохоров [и др.] // Гигиена и санитария. – 2019. – Т. 98, № 8. – С. 851–856.
37. Гаврилюк, Л.А. Влияние антиоксидантной терапии на состояние ферментной редокс-системы глутатиона пациентов с флегмонами / Л.А. Гаврилюк, А.В. Похиленко // Научная дискуссия: вопросы медицины. – 2016. – № 3 (34). – С. 6–12.
38. Ганиев, М.М. Химические средства защиты растений / М.М. Ганиев, В.Д. Недорезков. – М. : Колос, 2006. – 248 с.
39. Гар, К.А. Химические средства для борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных культур / К.А. Гар. – 3-е изд. перераб. и доп. – М. : Россельхозиздат, 1998. – 147 с.
40. Гигиена применения, токсикология пестицидов и клиника отравлений / под ред. Л.И. Медведя. – М. : Медицина, 1973. – Вып. 10. – 466 с.
41. Гольшин Н.М. Фунгициды / Н.М. Гольшин. – Москва : Колос, 1993. – 319 с.
42. Горожанская, Э.Г. Свободнорадикальное окисление и механизмы антиоксидантной защиты в нормальной клетке и при опухолевых

- заболеваниях (лекция) / Э.Г. Горожанская // Клин. лаб. диагностика. –2010. – № 6. – С. 28-44.
- 43.ГОСТ 25127-82. Межгосударственный стандарт. ТМТД технический. Технические условия : введен в действие Постановлением Госстандарта СССР от 10.02.1982 № 524 (ред. от 01.07.1986).
- 44.Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, 2020 год / Министерство сельского хозяйства Российской Федерации.
- 45.Гринстейн, Б. Наглядная биохимия : учебник : пер. с англ. / Б. Гринстейн, А. Гринстейн. – М. : ГЭОТАР Медицина, 2000. – 119 с.
- 46.Данилова, А.Э. Функционально-метаболическая активность эритроцитов в условиях экспериментального острого деструктивного панкреатита на фоне хронической алкогольной интоксикации / А.Э. Данилова, А.В. Сорокин, С.А. Долгарева // Innova. – 2018. – № 4 (13). – С. 39–42.
- 47.Динамика активности ферментов антирадикальной защиты и общей антиоксидантной активности при развитии экспериментального ишемически-реперфузионного поражения печени / К.А. Попов, И.М. Быков, Г.А. Ермакова, И.Ю. Цымбалюк // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2018. – Т. 22, № 2. – С. 171–182.
- 48.Доровских, В.А. В мире антиоксидантов / В.А. Доровских, С.С. Целуйко, Н.В. Симонова. – Благовещенск : Изд-во АГМА, 2012. – 234 с.
- 49.Доценко, О.И. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах и некоторых тканях мышей в условиях низкочастотной вибрации / О.И. Доценко, В.А. Доценко, А.М. Мищенко // Физика живого. – 2010. – Т. 18, № 1. – С. 107–113.
- 50.Дубинина, Е.Е. Биологическая роль супероксидного анион-радикала и супероксиддисмутазы в тканях организма / Е.Е. Дубинина // Успехи современной биологии. – 2001. – Т. 108, № 1. – С. 3-17.

51. Журавлев А.И. Биоантиокислители в животном организме // Биоантиокислители : тр. Московского о-ва испытателей природы / под ред. И.И. Иванова. – М. : Наука, 1975. – Т. 52. – С. 15-29.
52. Зайцев, В.Г. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антиоксидантов прямого действия / В.Г. Зайцев, О.В. Островский, В.И. Закревский // Эксперим. и клин. фармакология. – 2003. – Т. 66, № 4. – С. 66-70.
53. Зборовская, И.А. Антиоксидантная система организма, ее значение в метаболизме: клинически аспекты / И.А. Зборовская, М.В. Банникова // Вестн. РАМН. –1995. – № 6. – С. 53-60.
54. Здоровье человека и биосферы: комплексный медико-экологический мониторинг / Н.А. Агаджанян, О.И. Аптикаева, А.Г. Гамбурцев и др. // Экология человека.- 2005. - № 5. – С.3-9.
55. Зенков Н.К. Окислительный стресс / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. – М. : Наука, 2004. – 343 с.
56. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, № 3. – С. 286–296.
57. Зенков, Н.К. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. – Москва : МАИК «Наука/Интерпериодика». 2001. – 343 с.
58. Зозуля, Ю.А. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита при патологии головного мозга / Ю.А. Зозуля, В.А. Барабой, Д.А. Сутковой. – Москва : Знание-М, 2000. – 344 с.
59. Ижевский, С.С. Негативные последствия применения пестицидов / С.С. Ижевский // Защита и карантин растений. - 2006. – N5. - С.17.
60. Изменение прооксидантно-антиоксидантного баланса при хронической интоксикации банколом и эффективность профилактических мероприятий с применением мексидола / В.А. Королев, Ю.Д. Ляшев, И.В. Грибач, Н.Е.

- Кирищева // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". – 2014. – № 2. – С. 19–22.
61. Изменения в системе глутатиона при интраоперационной ишемии печени у крыс / И.Ю. Цымбалюк, К.А. Попов, К.И. Мелконян, А.П. Сторожук // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – С. 81.
62. Изучение процессов свободнорадикального окисления у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей / Т.З. Закиев, С.Р. Туйсин, О.В. Галимов [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2015. – Т. 96, № 3. – С. 302–306.
63. Исследование активности ферментов антиоксидантной защиты у больных с хроническим эндометритом / Н.В. Кириллова, О.М. Спасенкова, А.Г. Платонова, А.Г. Иванов // Естественные и технические науки. – 2017. – № 7. – С. 15–19.
64. Исследование антиоксидантных свойств лекарственных препаратов / Н.Г. Бердникова [и др.]. – М. : Русский врач, 2009. – 36 с.
65. Каган, В.Е. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов / В.Е. Каган, О.Н. Орлов, Л.Л. Прилипко // Итоги науки и техники. Сер. «Биофизика». – М. : ВИНТИ, 1986. – Т. 18. – С. 12-13.
66. Каган, Ю.С. Общая токсикология пестицидов / Ю.С. Каган. – Киев : Здоров'я, 1981. – 174 с.
67. Калинина, Е.В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редоксзависимых процессов / Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, Н.Д. Новичкова // Успехи биологической химии. – 2014. – Т. 54. – С. 299–348.
68. Карнозин и антиоксиданты природного происхождения как средства профилактики острого после нагрузочного окислительного стресса / Е.А. Рожкова, З.Г. Орджоникидзе, А.Е. Дружинин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т. 70, № 5. – С. 44–46.
69. Климова, Е.В. К проблеме воздействия стойких органических загрязнителей окружающей среды на сферу агропромышленного производства (защита

- здоровья человека и сельскохозяйственных животных) / Е.В. Климова // Ветеринария. – 2006. – № 3. – С. 685.
70. Ковальчук, В.И. Коррекция липидного состава мембран эритроцитов антиоксидантами у детей с острыми гнойными заболеваниями / В.И. Ковальчук, Б.И. Мацкевич // Система транспорта кислорода. – 2004. – № 1. – С. 55-61.
71. Колесниченко, Л.С. Глутатионтрансферазы / Л.С. Колесниченко, В.И. Кулинский // Успехи соврем. биологии. – 1989. – Т. 107, вып. 2. – С. 179-194.
72. Комаров, Ф.И. Биохимические исследования в клинике / Ф.И. Комаров, Б.Ф. Коровкин, В.В. Меньшиков. – Элиста : Джангар, 2001. – 216 с.
73. Комов, В.П. Биохимия / В.П. Комов, В.Н. Шведова. – М. : Дрофа, 2004. – 284 с.
74. Конторщикова, К.Н. Перекисное окисление в норме и патологии : учеб. пособие / К.Н. Конторщикова. – Н. Новгород, 2000. – 24 с.
75. Кормош, Н.Г. Физиологическая роль активных форм кислорода на клеточном уровне и организма в целом – взгляд клинициста. Часть. 2 / Н.Г. Кормош // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 1. – С. 85–90.
76. Коробкин, В.И. Экология / В.И. Коробкин, Л.В. Передельский. – Ростов н/Д : Феникс, 2000. – 576 с.
77. Коррекция избыточной активности перекисного окисления липидов как одного из этиологических факторов хирургического стресса препаратом мексидол в эксперименте / В.В. Кузьменко [и др.] // Биомедицина. – 2006. – Т. 1, № 4. – С. 92-93.
78. Котельников, С.В. Состояние перекисного окисления липидов в разных органах и тканях белых крыс в зимний и летний периоды в условиях кадмиевой интоксикации / С.В. Котельников, Н.Г. Соколова, А.В. Котельников // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2008. – Т. 146, № 9. – С. 264-265.

- 79.Кулинский, В.И. Обезвреживание ксенобиотиков / В.И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 8–12.
- 80.Курашвили, Л.В. Липидный обмен при неотложных состояниях / Л.В. Курашвили, В.Г. Васильков. – Пенза, 2003. – 198 с.
- 81.Куценко, С.А. Основы токсикологии / С.А. Куценко. – СПб., 2004. – 715 с.
- 82.Кушнерова, Н.Ф. Влияние интоксикации окислами азота на физиолого-метаболические характеристики эритроцитов и профилактика нарушений растительными полифенолами / Н.Ф. Кушнерова, С.Е. Кушнерова, Т.В. Кушнерова // Токсикол. вестн. – 2011. – № 4. – С. 20-23.
- 83.Лазаренко, В.А. Влияние синтетического аналога индолицидина на процессы перекисного окисления липидов при термических ожогах / В.А. Лазаренко, Ю.Д. Ляшев, Н.И. Шевченко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 157, № 4. – С. 443–445.
- 84.Ланкин, В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков. – М., 2001. – 78 с.
- 85.Латюшин, Я.В. Влияние хронического стресса на динамику перекисного окисления липидов в ткани костного мозга / Я.В. Латюшин // Вестн. Челябинск. гос. пед. ун-та. – 2008. – № 9. – С. 271-277.
- 86.Лебедева, С.Н. Оценка рациона питания и антиоксидантной активности биологических жидкостей организма студентов / С.Н. Лебедева, С.А. Жамсаранова // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87, № 1. – С. 35–43.
- 87.Лобырева, О.В. Активность антиоксидантных ферментов печени крыс при экспериментальном гипотиреозе и его коррекции йодсодержащим полисахаридным комплексом / О.В. Лобырева, Г.М. Абдуллина, Ф.Х. Камилов // Омск. науч. вестн. – 2011. – № 1 (104). – С. 92-94
- 88.Логвиновский, В.Д. Пестициды. Современные проблемы природопользования / В.Д. Логвиновский, О.П. Негрובה, Т.В. Логвиновская. – Воронеж, 2003. – 34 с.

- 89.Лудевиг, Р. Острые отравления : пер с нем. / Р. Лудевиг, К. Лос. – М. : Медицина, 1983. – 560 с.
- 90.Лужников, Е.А. Клиническая токсикология : учебник / Е.А. Лужников. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 1994. – 256 с.
- 91.Лунев, М.И. Оценка допустимого содержания ксенобиотиков и их метаболитов в растениях / М.И. Лунев // Химия в сельском хозяйстве. – 1986. - Т.25, №2. – С. 62-63.
- 92.Магомедов, М.Г. Влияние малых доз пестицидов на фоне дефицита йода и минеральных веществ в рационе на антиоксидантную способность жизненно важных органов в эксперименте / М.Г. Магомедов, М.К. Газимогомедова // Вестн. новых мед. технологий. – 2007. – Т. 14, № 3. – С. 24-26.
- 93.Майрапетян, А.Х. Экологические аспекты применения пестицидов в республике Армения и здоровье населения / А.Х. Майрапетян, Н.С. Татевосян // Экология человека. - 2001- №4. - С. 61-62.
- 94.Меерсон, Ф.З. Адаптация, стресс, профилактика / Ф.З. Меерсон. – М. : Наука, 1981. – 279 с.
- 95.Мезенцева, Л.В. Устойчивость физиологических функций и методы ее оценки / Л.В. Мезенцева, С.С. Перцов // Вестник новых медицинских технологий. – 2014. – Т. XX, № 1. – С. 12–17.
- 96.Мельников, Н.Н. Пестициды. Химия, технология и применение / Н.Н. Мельников. – Москва : Химия, 1987. – 712 с.
- 97.Мельников, Н.Н. Химия и технология пестицидов / Н.Н. Мелников. – М. : Химия, 1974. – 768 с.
- 98.Меньшикова, Е.Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е.Б. Меньшикова, Н.К. Зенков // Успехи соврем. биологии. – 1993. – Т 113, вып. 4. – С. 442-455.
- 99.Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде : справ. : в 2 т. / под ред. М.А. Клисенко. – М. : Колос, 1992. – Т. 2. – 785 с.

100. Нагоев, Б.С. Динамика показателей перекисного окисления липидов у больных сифилисом / Б.С. Нагоев, Ф.К. Бжахова // Клин. лаб. диагностика. – 2009. – № 1. – С. 13-15.
101. Николаев, В.М. Состояние про- и антиоксидантного равновесия у больных с холодовой травмой различной степени тяжести / В.М. Николаев, Р.З. Алексеев, С.Н. Алексеев // Сибирский медицинский журнал. – 2007. – Т. 22, № 2 (прил.). – С. 28–29.
102. Новиков, Ю.В. Экология, окружающая среда и человек / Ю.В. Новиков. - М: ФАИР-ПРЕСС, 2005. – С. 354 – 399.
103. Обеспеченность населения России микронутриентами и возможности ее коррекции / В.М. Коденцова, О.А. Вржесинская, Д.В. Рисник и [др.] // Вопросы питания. – 2017. – Т. 86, № 4. – С. 113–124.
104. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова [и др.]. – М. : Фирма «Слово», 2006. – 556 с.
105. Оковитый, С.В. Клиническая фармакология антиоксидантов / С.В. Оковитый // ФАРМиндекс-Практик. – 2003. – Вып. 5. – С. 85-111.
106. Омарова, З.М. Влияние пестицидов на здоровье детей / З.М. Омарова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2010. – Т. 55, № 1. – С. 59–64.
107. Оптимальное питание – основа здорового образа жизни / В.А. Тутельян, Н.Ф. Герасименко, Д.Б. Никитюк и [др.] // Здоровье молодежи: новые вызовы и перспективы. – Воронеж : Научная книга, 2019. – С. 228–249.
108. Особенности перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у женщин с хроническим эндометритом и репродуктивными нарушениями / Л. И. Колесникова, И.Н. Данусевич, Н.А. Курашова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 9-5. – С. 829–832.
109. Оценка риска воздействия пестицидов на работающих: методические указания МУ 1.2.3017-12. – Москва : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012. – 15 с.

110. Парахонский, А.П. Роль экологической патофизиологии в решении глобальных проблем цивилизации / А.П. Парахонский // *Фундаментальные исследования*. – 2006. – № 3. – С. 31–32.
111. Подобед, В.М. Современная антиоксидантная терапия / В.М. Подобед // *Новости экспертизы и регистрации*. – 2007. – № 10. – С. 115-118.
112. Показатели антиоксидантной защиты при остром и хроническом холецистите / Н.А. Терехина [и др.] // *Клин. лаб. диагностика*. – 2008. – № 4. – С. 41-43.
113. Попов, С.Я. Основы химической защиты растений : учебное пособие / С.Я. Попов, Л.А. Дорожкина, В.А. Калинин. – Москва : Арт-Лион, 2003. – 191 с. : ил.
114. Прадедова, Е.В. Классификация системы антиоксидантной защиты как основа рациональной организации экспериментального исследования окислительного стресса у растений / Е.В. Прадедова, О.Д. Ишеева, Р.К. Салаяев // *Физиология растений*. – 2011. – Т. 58, № 2. – С. 177–185.
115. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и влияние их на здоровье и старение человека / Я.И. Яшин, В.Ю. Рыжнёв, А.Я. Яшин [и др.]. – Москва : Транс Лит, 2009. – 212 с.
116. Пространственная организация каталазных белков / Б.К. Вайнштейн, В.Р. Мелик-Адамян, В.В. Барынин, А.А. Вагин // *Перспективы биоорганической химии и молекулярной биологии*. – Москва, 1986. – С. 91–96.
117. Размахин, Е.В. Перекисное окисление липидов и антирадикальная защита у больных после эндохирургического лечения желчнокаменной болезни / Е.В. Размахин, Б.С. Хышиктуев, С.Л. Лобанов // *Клин. лаб. диагностика*. – 2009. – № 1. – С. 5-7.
118. Разыграев, А.В. Роль глутатионпероксидаз в ткани эндометрия: факты, гипотезы, перспективы изучения / А.В. Разыграев, М.О. Матросова, И.А. Титович // *Журнал акушерства и женских болезней*. – 2017. – Т. 66, № 2. – С. 104–111.

119. Райс, Р.Х. Биологические эффекты токсических соединений : курс лекций / Р.Х. Райс, Л.Ф. Гуляева. – Новосибирск, 2003. – 208 с.
120. Рахманов, Р.С. Антиоксидантная система как показатель оценки состояния и прогнозирования здоровья населения / Р.С. Рахманов, Т.В. Блинова, А.В. Тарасов // Гигиена и санитария. – 2014. – № 6. – С. 91–94.
121. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – Москва : МедиаСфера, 2002. – 312 с.
122. Редокс-зависимая регуляция апоптоза: адаптивная роль активных форм кислорода при окислительном стрессе / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Н.Ю. Часовских [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2008. – Т. 94, № 6. – С. 710–718.
123. Рендов, Н.А. Применение пестицидов должно быть рентабельным / Н.А. Рендов, Т.В. Горбачева // Защита и карантин растений. -2007. – N10. - С.25.
124. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / отв. ред. Р.У. Хабриев. – Москва : Медицина, 2005. – 832 с.
125. Сазонтова, Т.Г. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов – равнозначных участников метаболизма / Т.Г. Сазонтова, Ю.В. Архипенко // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2007. – № 3. – С. 2–18.
126. Сазонтова, Т.Г. Стрессиндуцированные изменения функционирования Са-транспортирующей системы саркоплазматического ретикулула сердца и ее устойчивость к эндогенным повреждающим факторам / Т.Г. Сазонтова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1989. – Т. 108, № 9. – С. 271–274.
127. Саприн А.Н. Ферменты метаболизма и детоксикации ксенобиотиков / А.Н. Саприн // Успехи биол. химии. – 1991. – Т. 32. – С. 146-175.

128. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при воздействии органических растворителей в производстве / Р.Ф. Камилов [и др.] // Клин. лаб. диагностика. – 2009. – № 1. – С. 9-13.
129. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия / В.К. Казимирко, В.И. Мальцев, В.Ю. Бутылин, Н.И. Горобец. – Киев : Морион, 2004. – 159 с.
130. Свободнорадикальное окисление и сердечно-сосудистая патология: коррекция антиоксидантами / А.П. Голиков [и др.] // Лечащий врач. – 2003. – № 4. – С. 70-74.
131. Свободно-радикальное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.П. Козлов [и др.]. – М., 1972. – 88 с.
132. Сейфулла, Р.Д. Антиоксиданты / Р.Д. Сейфулла, Е.А. Рожкова, Е.К. Ким // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72, № 3. – С. 60–64.
133. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений / В.Д. Креславский, Д.А. Лось, С.И. Аллахвердиев, Вл.В. Кузнецов // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 2. – С. 163–178.
134. Сидоренко, Е.Н. Отравления пестицидами / Е.Н. Сидоренко. – Киев : Вища школа, 1978. – 154 с.
135. Системы свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты как индикаторы активности пролиферации кератиноцитов при псориазе / Р.А. Гришин [и др.] // Клин. лаб. диагностика. – 2010. – № 1. – С. 18-24.
136. Скворцов, В.В. Пероксидация липидов и антиоксидантная система в гепатологии / В.В. Скворцов // Гепатология. – 2003. – № 3. – С. 7-13.
137. Собакарь, М.С. Антиоксидантная терапия и метаболические подходы к лечению заболеваний сердечно-сосудистой системы / М.С. Собакарь, Е.В. Ших // Биомедицина. – 2010. – № 3. – С. 10-21.

138. Содержание малонового диальдегида и активность антиоксидантных ферментов в плазме крови больных механической желтухой / Н.М. Титова [и др.] // Клин. лаб. диагностика. – 2002. – № 2. – С. 32-37.
139. Солдатенков, А.Т. Пестициды и регуляторы роста: прикладная и органическая химия / А.Т. Солдатенков, Н.М. Колядина, А. Ле Туан. – Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 223 с. : ил. – (Библиотека классического университета).
140. Справочник по пестицидам (гигиена применения и токсикология) / под ред. Л.И. Медведя. – Киев : Урожай, 1974. – 448 с.
141. Справочник по пестицидам / Н.Н. Мельников, К.В. Новожилов, С.Р. Белан, Т.Н. Пылова. – Москва : Химия, 1985. – 351 с.
142. Сравнительная антиоксидантная и антигипоксическая активность нового производного 1,4-дигидро-4-оксопиридина - соединения РДМрТ НС1 и мексидола / Е.В. Петрова [и др.] // Эксперим. и клин. фармакология. – 2013. – Т. 76, № 6. – С. 38-40.
143. Сравнительная оценка антиокислительной активности и содержания прооксидантных факторов у различных групп пищевых продуктов / И.М. Быков, А.А. Басов, М.И. Быков, Р.А. Ханферьян // Вопросы питания. – 2014. – Т. 83, № 4. – С. 75–81.
144. Сравнительная оценка антиоксидантных свойств иммунорегуляторных препаратов / А.В. Тутельян, Г.И. Клебанов, С.Е. Ильина, О.Б. Любицкий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 136, № 8. – С. 179–183.
145. Тарасов, А.В. Основы токсикологии / А.В. Тарасов, Т.В. Смирнова. – М. : Маршрут, 2006. – 157 с.
146. Терехина, Н.А. Свободно-радикальное окисление и антиоксидантная система (теория, клиническое применение, методы) / Н.А. Терехина, Ю.А. Петрович. – Пермь, 1992. – 35 с.

147. Трегубова, И.А. Антиоксиданты: современное состояние и перспективы / И.А. Трегубова, В.А. Косолапов, А.А. Спасов // Успехи физиологических наук. – 2012. – Т. 43, № 1. – С. 75–94.
148. Улащик, В.С. Активные формы кислорода, антиоксиданты и действие лечебных физических факторов / В.С. Улащик // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2013. – № 1. – С. 60–69.
149. Химическая защита растений : учебник / под ред. Г.С. Груздева. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва : Агропромиздат, 1987. – 415 с. : ил.
150. Химическая и биологическая защита растений / П.А. Хижняк, Г.А. Бегляров, В.Г. Стативкин, А.М. Никифоров ; под ред. П.А. Хижняка, – Москва : Колос, 1971. – 214 с. : ил.
151. Чеплашкина, Е.Б. Трансферазы в тканях легких у крольчат в раннем постнатальном периоде / Е.Б. Чеплашкина, Н.Г. Игнатъев // РВЖ. – 2013. – № 4. – С. 16-17.
152. Черешнев, В.А. Экология, мониторинг и здоровье людей / В.А. Черешнев, А.Г. Гамбурцев // Вестник Российской академии наук. – 2017. – Т. 87, № 2. – С. 121–129.
153. Черных, А.М. Гигиеническая оценка ксочетанного действия электромагнитного поля и пестицидов в эксперименте / А.М. Черных // Гигиена и санитария. – 2003. – № 2. – С. 56-58.
154. Чеснокова, Н.П. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 7. – С. 29–36.
155. Чурсина, Т.В. Перекисное окисление липидов и антиокислительная защита у больных ИБС и возможности коррекции с помощью велотренировок по методике свободного выбора нагрузки / Т.В. Чурсина, А.В. Молчанов, В.П. Михин // Терапевт. арх. – 2007. – № 1. – С. 48-52.

156. Шанин, Ю.Н. Антиоксидантная терапия в клинической практике / Ю.Н. Шанин, В.Ю. Шанин, Е.В. Зиновьев. – Санкт-Петербург : ЭЛБИ-СПб, 2003. – 128 с.
157. Шаповал, Г.С. Механизмы антиоксидантной защиты организма при действии активных форм кислорода / Г.С. Шаповал, В.Ф. Громова // Украинский биохимический журнал. – 2003. – Т. 75, № 2. – С. 5–13.
158. Шаповалова, В.П. Состояние липидного обмена при воздействии шума и алюминиевой пыли / В.П. Шаповалова, Т.В. Рыжова, В.М. Рыжов // Медицина труда и промышленная экология. – 2010. – № 7. – С. 18-20.
159. Шевкопляс-Гурьева, Н.А. Применение пестицидов и их влияние на окружающую среду и здоровье человека / Н.А. Шевкопляс-Гурьева, Г.А. Сивкова. – Инновационная наука. – 2020. – № 12. – С. 15–16.
160. Шепелев, А.П. Роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных болезней / А.П. Шепелев, И.В. Корниенко, А.В. Шестопапов // Вопр. мед. химии. – 2000. – Т. 46, № 2. – С. 110-116.
161. Экспериментальное обоснование влияния липофильных продуктов растительного происхождения на показатели липидного обмена у крыс / М.И. Быков, А.А. Басов, Е.Е. Есауленко, А.Н. Курзанов // Вопросы питания. – 2015. – Т. 84, № 5. – С. 31–38.
162. Эллиот, В. Биохимия и молекулярная биология / В. Эллиот, Д. Эллиот. – Москва : Наука/Интерпериодика, 2002. – 446 с.
163. Эффекты хронического мягкого стресса у крыс Вистар и Август: поведение и содержание моноаминов в стриатуме / Н.А. Крупина, Н.Н. Хлебникова, И.Н. Орлова [и др.]// Патогенез. – 2012. – Т. 10, № 2. – С. 50–58.
164. Юрченко, И.В. К клинике, патогенезу и лечению интоксикаций производными дитиокарбаминовой кислоты / И.В. Юрченко, Г.М. Балан, Е.М. Юрченко // Современные проблемы токсикологии. – 2009. – № 2. – С. 29–37.

165. A ret-prospective analysis of acute reference dose for pesticides evaluated in the European Union / R. Solecki [et al.] // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2010. – Vol. 40. – P. 24-34.
166. Agarwal, A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction / A. Agarwal, R.A. Saleh, M.A. Bedaiwy // *Fertility and Sterility.* – 2003. – Vol. 79, Iss. 4. – P. 829–843.
167. Ameliorative effect of á-tocopherol on cypermethrin induced oxidative stress and lipid peroxidation in Wistar rats / R. Raina, P.K. Verma, N.K. Pankaj, V. Kant // *International Journal of Medical Sciences.* – 2009. – Vol. 1, Iss. 9. – P. 396–399.
168. Ameliorative effect of beta vulgaris root extract on chlorpyrifos-induced oxidative stress, inflammation and liver injury in rats / G. Albasher, R. Almeer, F.O. Al-Otibi [et al.] // *Biomolecules.* – 2019. – Vol. 9, Iss. 7. – Art. 261.
169. Ameliorative effect of vitamin C and E on hematological alterations induced by chlorpyrifos alone and in conjunction with fluoride in Wistar rats / N. Baba, R. Raina, P. Verma [et al.] // *Journal of Experimental and Integrative Medicine.* – 2013. – Vol. 3, Iss. 3. – P. 213–218.
170. Amstad, P. Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu, Zn-superoxide dismutase overproducers to oxidant stress / P. Amstad, R. Moret, P. Cerutti // *Journal of Biological Chemistry.* – 1994. – Vol. 269. – P. 1606–1609.
171. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables / J.L. Tadeo, C. Sanchez-Brunete, R.A. Perez, M.D. Fernandez. - Madrid: Elsevier, 2000. - Vol. 882. - P. 175-191.
172. Arthur, J.R. The glutathione peroxidases / J.R. Arthur // *Cellular and Molecular Life Sciences.* – 2000. – Vol. 57, Iss. 13–14. – P. 1825–1835.
173. Astiz, M. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals / M. Astiz, M.J. de Alaniz, C.A. Marra // *Environmental Toxicology and Pharmacology.* – 2009. – Vol. 28, Iss. 3. – P. 465–473.

174. Astiz, M. Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues / M. Astiz, M.J. de Alaniz, C.A. Marra // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2009. – Vol. 72, Iss. 7. – P. 2025–2032.
175. Astiz, M. The oxidative damage and inflammation caused by pesticides are reverted by lipoic acid in rat brain / M. Astiz, M.J. de Alaniz, C.A. Marra // *Neurochemistry International*. – 2012. – Vol. 61, Iss. 7. – P. 1231–1241.
176. Autoimmune reactivity to malondialdehyde adducts in systemic lupus erythematosus is associated with disease activity and nephritis / U. Hardt, A. Larsson, I. Gunnarsson [et al.] // *Arthritis Research and Therapy*. – 2018. – Vol. 20, Iss. 1. – Art. 36.
177. Ayala, A. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal / A. Ayala, M.F. Muñoz, S. Argüelles // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2014. – Vol. 2014. – Art. 360438.
178. Bajaj, J.S. Environmental release of chemicals and reproductive ecology / J.S. Bajaj, A. Misra, M. Rajalakshmi // *Environ. Health Perspect.* 1993. -Vol.101, Suppl. 2. -P.125-130.
179. Assessing the effects of Thiram to oxidative stress responses in a freshwater bioindicator cladoceran (*Daphnia magna*) / C. Belaid, I. Sbartai // *Chemosphere*. – 2021. – Vol. 268. – Iss. 128808.
180. Biarnason, I.T. The effects on NSAID on the small intestine: clinical implications / I.T. Biarnason // *New Standarts in Arthritis Care*. – 1997. – Vol. 6, N 2. – P. 2.
181. Biological markers of oxidative stress: applications to cardiovascular research and practice / E. Ho, K. Karimi Galougahi, C.C. Liu [et al.] // *Redox Biology*. – 2013. – Vol. 1, Iss. 1. – P. 483–491.
182. Biomarkers of oxidative damage in human disease / I. Dalle-Donne, R. Rossi, R. Colombo [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 2006. – Vol. 52, no. 4. – P. 601–623.

183. Biswas, S.K. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione / S.K. Biswas, I. Rahman // *Molecular aspects of medicine*. – 2009. – Vol. 30, Iss. 1–2. – P. 60–76.
184. Board, P.G. Glutathione Transferases, Regulators of Cellular Metabolism and Physiology / P.G. Board, D. Menon // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2013. – Vol. 1830, Iss. 5. – P. 3267–3288.
185. Brigelius-Flohe, R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors / R. Brigelius-Flohe // *Biological chemistry*. – 2006. – Vol. 387, Iss. 10–11. – P. 1329–1335.
186. Butkowski, E.G. Hyperglycaemia, oxidative stress and inflammation markers / E.G. Butkowski, H.F. Jelinek // *Redox Report*. – 2017. – Vol. 22. – P. 257–264.
187. Carlioz, A. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? / A. Carlioz, D. Touati // *The EMBO journal*. – 1986. – Vol. 5, Iss. 3. – P. 623–630.
188. Cash, T.P. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing / T.P. Cash, Y. Pan, M.C. Simon // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2007. – Vol. 43, Iss. 9. – P. 1219–1225.
189. Catalase-overexpressing thymocytes are resistant to glucocorticoid-induced apoptosis and exhibit increased net tumor growth / M.E. Tome, A.F. Baker, G. Powis [et al.] // *Cancer Research*. – 2001. – Vol. 61, Iss. 6. – P. 2766–2773.
190. Changes in antioxidant defense systems induced by thiram in V79 chinese hamster fibroblasts / E. Grosicka-Maciag, D. Kurpios, H. Czeczot [et al.] // *Toxicology In Vitro*. – 2008. – Vol. 22, Iss. 1. – P. 28–35.
191. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts / L. Zhuang [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 959–968.
192. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress / J. Frijhoff, P.G. Winyard, N. Zarkovic [et al.] // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2015. – Vol. 23, Iss. 14. – P. 1144–1170.

193. Čolak, E. New markers of oxidative damage to macromolecules / E. Čolak // *JMB.* – 2008. – Vol. 27, Iss. 1. – P. 1–16.
194. Common structural features of MAPEG – a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism / P.J. Jakobsson, R. Morgenstern, J. Mancini [et al.] // *Protein Science.* – 1999. – Vol. 8, Iss. 3. – P. 689–692.
195. Comparative study of oxidative stress biomarkers in urine of cooks exposed to three types of cooking-related particles / Y. Ke, L. Huang, J. Xia [et al.] // *Toxicology Letters.* – 2016. – Vol. 255. – P. 36–42.
196. Cumulative risk assessment of pesticide RESIDUES in food / A.R. Boobis [et al.] // *Toxicol. Lett.* – 2008. – Vol. 180, N 2. – P. 137-150.
197. Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes / M. Deponte // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2013. – Vol. 1830, Iss. 5. – P. 3217–3266.
198. Devine, G.J. Insecticide USE: contexts and ecological consequences / G.J. Devine, M.J. Furlong. // *Agriculture and Human Values.* –2007. – Vol. 24, N 3. – P. 281-306.
199. Dietary protein defines stress resistance, oxidative damages and antioxidant defense system in *Drosophila melanogaster* / O. Strilbytska, A. Zayachkivska, T. Strutynska [et al.] // *Ukrainian Biochemical Journal.* – 2021. – Vol. 93, no. 5. – P. 90–101.
200. Different sensitivities of native and oxidized forms of Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase to intracellular proteinases / N. Zolotarjova, C. Ho, R.L. Mellgren [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1994. – Vol. 1192, Iss. 1. – P. 125–131.
201. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase / Y. Li, T.T. Huang, E.J. Carlson [et al.] // *Nature Genetics.* – 1995. – Vol. 11, Iss. 4. – P. 376–381.
202. Dinham, B. *The Pesticide Hazard: A Global Health and Environmental Audit* / B. Dinham. New York, 1993. - P. 32-33.

203. Diversity of the human intestinal microbial flora / P.B. Eckburg [et al.] // *Science*. – 2005. – Vol. 308, N 5728. – P. 1635-1638.
204. Dodge, J.T. Autoxidation as a cause of altered lipid distribution in extracts from human red cells / J.T. Dodge, G.B. Phillips // *J. Lipid Res.* – 1966. – Vol. 7. – P. 387-394.
205. Durham, W. Mutagenic, tetratogenic and Carcinogenic Properties of Pesticides / W. Durham, C. Williams // *Ann.Rec.Enviroin.* 1972. - Vol. 17.-P. 123.
206. Effect of vitamin C and E on oxidative stress and antioxidant system in the salivary glands of STZ-induced diabetic rats / F.K. Ibuki, C.T. Bergamaschi, M. da Silva Pedrosa, F.N. Nogueira // *Archives of Oral Biology*. – 2020. – Vol. 116. – Art.104765.
207. Effect of yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis* / E. Ortiz-Ordonez, E. Uria-Galicia, R.A. Ruiz-Picos [et al.] // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2011. – Vol. 61, Iss. 3. – P. 443–452.
208. Effects of a-lipoic acid, vitamins E and C upon the heat stress in Japanese quails / M. Halici, H. Imik, M. Koç, R. Gümüş // *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. – 2012. – Vol. 96, Iss. 3. – P. 408–415.
209. Eldefrawi, M.E. Effects of enviromental toxicans on nicotinic acethylcholine receptors: action of pyrethroids / M.E. Eldefrawi, M.A. Abbassy, A.T. Eldefrawi // *Cellular and molecular neurotoxicology* / ed. T. Narahashi. — N. Y.:Ravenpress,2007.—P.177—189.
210. Elemental status of students with different levels of adaptation / S.V. Notova, E.V. Kiyaeva, I.V. Radysh [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2017. – Vol. 163, № 5. – P. 590–593.
211. Etsuo, N. Evidence for beneficial effects of vitamin E / N. Etsuo // *The Korean Journal of Internal Medicine*. – 2015. – Vol. 30, Iss. 5. – P. 571–579.
212. Fatty liver induced by free radicals and lipid peroxidation / M. Morita [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2012 – Vol. 46, N 6 – P. 758-765.

213. Flohé, L. Selenoproteins of the Glutathione Peroxidase Family / L. Flohé, R. Brigelius-Flohé // *Selenium. Its Molecular Biology and Role in Human Health*. – New York : Springer, 2012. – P. 167–180.
214. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer / M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol [et al.] // *Chemico-Biological Interactions*. – 2006. – Vol. 160, Iss. 1. – P. 1–40.
215. Frei, B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma / B. Frei, R. Stocker, B.N. Ames // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. – 1988. – Vol. 85, Iss. 24. – P. 9748–9752.
216. Fridovich, I. Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters // *The Journal of biological chemistry*. – 1997. – Vol. 272, Iss. 30. – P. 18515–18517.
217. Fridovich, I. Superoxide anion radical and superoxide dismutases / I. Fridovich // *Annual review of biochemistry*. – 1995. – Vol. 64. – P. 97–112.
218. Frova, C.C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives / C.C. Frova // *Biomolecular engineering*. – 2006. – Vol. 23, Iss. 4. – P. 149–169.
219. Gero, V. FAO pesticide specifications - review and withdrawal of old specifications / V. Gero // *Pesticide Outlook*. – 2002. – Vol. 12, N 6. – P. 239.
220. Ginger (*zingiber officinale*) might improve female fertility: A rat model / N. Yilmaz, B. Seven, H. Timur [et al.] // *Journal of the Chinese Medical Association*. – 2018. – Vol. 81, Iss. 10. – P. 905–911.
221. Giray, B. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by Vitamin E or Allopurinol / B. Giray, A. Gurbay, F. Hincal // *Toxicol. Letters*. – 2001. – Vol. 118. – P. 139-146.
222. Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation / J. Markovic, C. Borrás, A. Ortega [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282, Iss. 28. – P. 20416–20424.
223. Glutathione, glutathione-dependent enzymes and antioxidant status in erythrocytes from children treated with high-dose paracetamol / E. Kozer, S.

- Evans, J. Barr [et al.] // *British journal of clinical pharmacology*. – 2003. – Vol. 55, Iss. 3. – P. 234–240.
224. Golberg, D.M. Glutathione reductase / D.M. Golberg, R.J. Spooner // *Methods of Enzymatic Analysis* / ed.: H. U. Bergmayer. – 2nd ed. – Verlag-Chemie, 1992. – P. 258–265.
225. Gutteridge, J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage // *Clinical Chemistry*. – 1995. – Vol. 41, N 12. – P. 1819-1828 .
226. Gutteridge, J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidation as biomarkers of tissues damage / J.M.C. Gutteridge // *Clinikal Chemistry* – 2005. – Vol. 41, N 12. – P. 1819-1828.
227. Halliwell, B. Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning) / B. Halliwell // *Free Radical Research*. – 1999. – Vol. 31. – P. 261-272.
228. Halliwell, B. Oxygen toxiciti, oxygen radicals, transition metals and disease / B. Halliwell, J.M.C Gutteridge // *Biochem. J.* – 1984. – Vol. 219, N 1. – P. 1-14.
229. Halliwell, B. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases / B. Halliwell, J.M. Gutteridge // *Molecular Aspects of Medicine*. – 1985. – Vol. 8, Iss. 2. – P. 89–193.
230. Hayes, J.D. Glutathione transferases / J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 2005. – Vol. 45. – P. 51–88.
231. Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2- ASK1 signals / Y. Wu, Y. Fan, B. Xue [et al.] / *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25, Iss. 42. – P. 5787–5800.
232. Hundekari, I.A. Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous pesticides poisoning cases of North Karnataka (India) / I.A. Hundekari, A.N. Suryakar, D.B. Rathi // *J. Environ. Health. Res.* – 2011. – Vol. 11. – P. 39-44.

233. Impaired reproductive development in sons of women occupationally exposed to pesticides during pregnancy / H.R. Andersen, I.M. Schmidt, P. Grandjean [et al.] // *Environ Health Perspect.* – 2008. – Vol. 116. – P. 566-572.
234. International Agency for Research on Cancer. IARC working group, Thiram // *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans.* – Lyon : International Agency for Research on Cancer, 1991. – Vol. 53. – P. 403–422.
235. Jaga, K. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides / K. Jaga, C. Dharmani // *Am. J. Pub. Health.* – 2003. – Vol. 14, N 3. – P. 171-185.
236. Kannan, K. Defective lymphocyte transformation by DDT in vitro responsiveness of rabbit peripheral blood lymphocytes to PHA/J.D. Sharma / K. Kannan // *Indian. J. Exp. Biol.* – 1979. – Vol. 17, N 8. – P. 805-806.
237. Kavlock, R.J., Austin C.P., Tice R.R. Toxicity testing in the 21st century: implications for human health risk assessment // *Risk Anal.* – 2009. – Vol. 29. – P. 485-487.
238. Khouw, A.S. Radioiodination of low density lipoprotein initiates lipid peroxidation: protection by use of antioxidants / A.S. Khouw, S. Parthasarathy, J.L. Witztum // *J. Lipid Res.* – 1993. – Vol. 34, N 9. – P. 1483-1496.
239. Landis, G.N. Superoxide dismutase evolution and life span regulation / G.N. Landis, J. Tower // *Mechanisms of Ageing and Development.* – 2005. – Vol. 126, Iss. 3. – P. 365–379.
240. Lin N., Garry V.F. In vitro studies of cellular and molecular developmental toxicity of adjuvants, herbicides, and fungicides commonly used in Red River valley, Minnesota // *J Toxicol Environ Health A.* – 2000. – Vol. 60. – № 6. – P. 423-439.
241. Lin, H. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens / H.Lin, E. Decuyper, J. Buyse // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A.* – 2006. – Vol. 144, Iss. 1. – P. 11–17.

242. Lipid peroxidation: an overview / N. Gahalain [et al.] // *IJPSR*. – 2011. – Vol. 2. – № 11. – P. 2757-2766.
243. Liu, K. Thiram exposure in environment: A critical review on cytotoxicity / K. Liu, Y. Li, M. Iqbal, Z. Tang, H. Zhang // *Chemosphere*. – 2022. – Vol. 295. – Iss. 133928.
244. Lu, S.C. Glutathione synthesis / S.C. Lu // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2013. – Vol. 1830, Iss. 5. – P. 3143–3153.
245. Lukkesfeldt, J. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals / J. Lukkesfeldt, O. Svendsen // *The Veterinary Journal*. – 2007. – Vol. 173, Iss. 3. – P. 502–511.
246. Lushchak, V.I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions / V.I. Lushchak // *Journal of Amino Acids*. – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 736837.
247. Lyons, G. Mixed messages: Pesticides that confuse hormones / G. Lyons // *Pesticide Action Network*. – 2000. – N 2. – P. 1-6.
248. Martinez-Moral, M.P. How stable is oxidative stress level? An observational study of intra- and inter-individual variability in urinary oxidative stress biomarkers of DNA, proteins, and lipids in healthy individuals / M.P. Martinez-Moral, K. Kannan // *Environment International*. – 2019. – Vol. 123. – P. 382–389.
249. Melatonin protects against renal oxidative stress after obstructive jaundice in rats / A. Cruz, F.J. Padillo, I. Tunez [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2001. – Vol. 425, Iss. 2. – P. 135–139.
250. Membrane lipid peroxidation induces changes in gamma-[3H]aminobutyric acid transport and calcium uptake by synaptosomes / C. Palmeira, M. Santos, A. Carvalho, C. Oliveira // *Brain Research*. – 1993. – Vol. 609, P. 1-2. – P. 117–123.
251. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties / L.M. Magalhaes, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima // *Analytica Chimica Acta*. – 2008. – Vol. 613, Iss. 1. – P. 1–19.

252. Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance / R. Mittler // Trends in Plant Science. – 2002. – Vol. 7, Iss. 9. – P. 405–410.
253. Nagata, K. Characterization of mitochondrial aspartate aminotransferase from the liver of pyridoxine-deficient rats / K. Nagata, M. Okada // J. Biochem. – 1985. – Vol. 97, N 2. – P. 501-507.
254. Nebbia, C. Inhibition of hepatic xenobiotic metabolism and of glutathione-dependent enzyme activities by zinc ethylene-bis-dithiocarbamate in the rabbit / C. Nebbia, M. Dacasto, M.G. Soffietti, R. Rasero, G.B. Principato, P. Di Simplicio // BMC Pharmacology and Toxicology. – 1993. – Vol. 73.
255. Nenad, A. Determination of pesticide residuals in agricultural products / A. Nenad // Ecologica. – 2009. – N 3. – P. 605-609.
256. Noctor, G. The metabolomics of oxidative stress / G. Noctor, C. Lelarge-Trouverie, A. Mhamdi // Phytochemistry. – 2015. – Vol. 112. – P. 33–53.
257. Nieto, A. Assessment of profilin as an allergen for latex-sensitized patients / A. Nieto, A. Mazón, M. Boquete, F. Carballada, J. A. Asturias, J. Martínez, A. Martínez // european journal of allergy and clinical immunology. – 2002. – Vol.57, Iss. 9. – P. 776–784. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2002.23530.x>
258. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury / J.D. Lang [et al.] // Chest. – 2002. – Vol. 122 (Suppl. 6). – P. 314-320.
259. Oxidative biochemistry disbalance and changes on proteomic profile in salivary glands of rats induced by chronic exposure to methylmercury / L.O. Bittencourt, B. Puty, S. Charone [et al.] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2017. – Vol. 2017. – Article ID 5653291.
260. Oxidative Stress and Antioxidant Defense / E. Birben, U.M. Sahiner, C.Sackesen [et al.] // World Allergy Organization Journal. – 2012. – Vol. 5, Iss. 1. – P.9–19.
261. Oxidative stress effects in the uterus, placenta and fetus of pregnant rats submitted to acute and chronic stress / A.S. Silveira, R.D. Aydos, R.T. Ramalho [et al.] // Acta Cirúrgica Brasileira. – 2018. – Vol. 33, Iss. 9. – P.806–815.

262. Oxidative stress markers differ in two placental dysfunction pathologies: pregnancy-induced hypertension and intrauterine growth restriction / A.Zygula, P. Kosinski, P. Wroczynski [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2020. – Vol. 2020. – Ar. 1323891.
263. Oxidative stress markers in preeclamptic placentas: a systematic review with meta-analysis / R.C. Ferreira, M.B. T. Fragoso, N.B. Bueno [et al.] // *Placenta*. – 2020. – Vol. 99. – P. 89–100.
264. Oxidative stress, genotoxicity, biochemical and histopathological modifications induced by epoxiconazole in liver and kidney of Wistar rats / H. Hamdi, Y.B. Othmène, O. Ammar [et al.] // *Environmental science and pollution research international*. – 2019. – Vol. 26, Iss. 17. – P. 17535–17547.
265. Ozone therapy ameliorates inflammation and endometrial injury in rats with pelvic inflammatory disease / An Wei, Hao Feng, Xiao-Min Jia [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2018. – Vol. 107. – P. 1418–1425.
266. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1 / J.E. Ladner, J.F. Parsons, C.L. Rife [et al.] // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43, Iss. 2. – P. 352–361.
267. Pathological aspects of lipid peroxidation / A. Negre-Salvayre // *Free Rad. Res.* – 2010 – Vol. 48, N 10 – P. 2747-2753.
268. Persistent chlorinated pesticides in fish and cattle fat and their implications for human serum concentrations from the sene-gambian region / P. Manirakiza [et al.] // *J. Environ. Monitoring*. – 2002. –Vol. 4, N 4. – P. 609-617.
269. Pesticide residues in food 2010 / REPORT 2010 Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Rome, 2010 – 55 p.
270. Pesticide specifications: Manual on Development and use of FAO and WHO Specifications for Pesticides. First Edition. Prepared by the FAO/WHO joint meeting on pesticide specifications // *JMPS*. – 2006
271. Pesticide Terminal Residue / ed. A.S.Tahori. - London. Butteworchs, 2002.- P. 365.

272. Pham-Huy, L.A. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health / L.A. Pham-Huy, H.He, C. Pham-Huy // *International Journal of Biomedical Science*. – 2008.– Vol. 4, Iss. 2.– P. 89–96.
273. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise / S. Chevion, D.S. Moran, Y. Heled [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – Vol. 100, Iss. 9. – P. 5119–5123.
274. Plasma phosphatidylcholine hydroperoxide as a new marker of oxidative stress in alcoholic patients / J. Adachi, S. Matsushita, N. Yoshioka [et al.] // *Journal of Lipid Research*. – 2004. – Vol. 45, Iss. 5. – P. 967–971.
275. Pocsi, I. Glutathione, altruistic metabolite in fungi / I. Pocsi, R.A. Prade, M.J. Pennickx // *Advances in microbial physiology*. – 2004. – Vol. 49. – P. 1–76.
276. Rapport, S.M. Catalase and glutathione peroxidase / S.M. Rapport, M.W. Muller // *J. Biol. Chem.* – 1979. – № 14. – P. 176–179.
277. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling / L.A. Del Río, L.M. Sandalio, F.J. Corpas [et al.] // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 141, Iss. 2. – P. 330–335.
278. Reactive Oxygen Species Differentially Affect T Cell Receptor-Signaling Pathways / S. Cemerski, A. Cantagrel, J.P. Van Meerwijk, P. Romagnoli // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277, Iss. 22. – P. 19585–19593.
279. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: problems solved? / A. Görlach, E.Y. Dimova, A. Petry [et al.] // *Redox Biology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 372–385.
280. Redox homeostasis managers in plants under environmental stresses / N.A. Anjum, N.A. Khan, A. Sofo [et al.] // *Frontiers in Environmental Science*. – Vol. 4. – Art. 35. – URL: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00035>.
281. Redox status expressed as GSH: GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients / O. Zitka, S. Skalickova, J. Gumulec [et al.] // *Oncology letters*. – 2012. – Vol. 4, Iss. 6. – P. 1247–1253.

282. Relationship between free and total malondialdehyde, a well-established marker of oxidative stress, in various types of human biospecimens / X. Cui, J. Gong, H. Han [et al.] // *Journal of Thoracic Disease*. – 2018. – Vol. 10, Iss. 5. – P. 3088–3197.
283. Repetto, M. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination / M. Repetto, J. Semprine, A. Boveris // *Lipid Peroxidation* / ed.: A. Catala. – IntechOpen: London, UK, 2012. – URL: <https://doi.org/10.5772/45943>.
284. Rice-Evans C. Total antioxidant status in plasma and body fluids / C. Rice-Evans, N.J. Miller // *Methods in enzymology. Oxygen radicals in biological systems* / ed. L. Packer. – San Diego, California : Academic Press, Inc., 1994. – Vol. 234, Part D. – P. 279–293.
285. Salam, R. Potential of RT, bagging and RS ensemble learning algorithms for reference evapotranspiration prediction using climatic data-limited humid region in Bangladesh / R. Salam, A.R.M.T. Islam // *Journal Hydrol.* – 2020. – Vol. 590. – Art. 125241. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.125241>
286. Sies, H. Jones Oxidative stress / H. Sies, C. Berndt, D.P. Jones // *Annual Review of Biochemistry*. – 2017. – Vol. 86, no. 1. – P. 715–748.
287. Sies, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine / H. Sies // *Redox Biology*. – 2015. – Vol. 4. – P. 180–183.
288. Simon, H.U. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction / H.U. Simon, A. Haj-Yehia, F. Levi-Schaffer // *Apoptosis*. – 2000. – Vol. 5, Iss. 5. – P. 415–418.
289. Simultaneous detection of the enzyme activities of GPx1 and GPx4 guide optimization of selenium in cell biological experiments / J.M. Stolwijk, K.C. Falls-Hubert, C.C. Searby [et al.] // *Redox Biology*. – 2020. – Vol. 32. – Art. 101518.
290. Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity / R.M. Green, M. Graham, M.R. O'Donovan [et al.] // *Mutagenesis*. – 2006. – Vol. 21, Iss. 6. – P. 383–390.

291. Sugino, N. Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum / N.Sugino // *Animal Science Journal*. – 2006. – Vol. 77, Iss. 6. – P. 556–565.
292. Superoxide anions produced by *Streptococcus pyogenes* group A-stimulated keratinocytes are responsible for cellular necrosis and bacterial growth inhibition / E. Regnier, P.A. Grange, G. Ollagnier [et al.] // *Innate immunity*. – 2016. – Vol. 22, Iss. 2. – P. 113–123.
293. Szymczynsky, S.A. Comparison of content of chlorinated pesticide residues in human semen, testicles and fat tissue / S.A. Szymczynsky, S.H. Waliszewski // *Andrologia*. – 2001. – Vol.13. – P. 250—252.
294. Taravati, A. Comprehensive analysis of oxidative stress markers and antioxidants status in preeclampsia / A. Taravati, F. Tohidi // *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. – 2018. – Vol. 57, no. 6. – P. 779–790.
295. Tew, K.D. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death / K.D. Tew, D.M. Townsend // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2012. – Vol. 17, Iss. 12. – P. 1728–1737.
296. The Advanced Lipoxidation End-Product Malondialdehyde-Lysine in Aging and Longevity / M. Jové, N. Mota-Martorell, I. Pradas [et al.] // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9, Iss. 11. – Art. 1132.
297. The correlation between oxidative stress level and intra-abdominal fat in obese males / X.J. Jia, L.X. Liu, Y.M. Tian [et al.] // *Medicine*. – 2019. – Vol. 98, Iss. 7. – Art. e14469.
298. The effects of vitamin E supplementation on malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in haemodialysis patients: A systematic review and meta-analysis / P. Bergin, A. Leggett, C.R. Cardwell [et al.] // *BMC Nephrology*. – 2021. – Vol. 22, Iss. 1. – Art. 126.
299. The fungicide thiram perturbs gut microbiota community and causes lipid metabolism disorder in chickens / A. Kong, C. Zhang, Y. Cao [et al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2020. – Vol. 206. – Art. 111400.
300. The Mu class glutathione transferase is abundant in striated muscle and is an isoform-specific regulator of ryanodine receptor calcium channels / Y.

- Abdellatif, D. Liu, E.M. Gallant [et al.] // *Cell Calcium*. – 2007. – Vol. 41, Iss. 5. – P. 429–440.
301. The single-nucleotide polymorphism (GPX4c718t) in the glutathione peroxidase 4 gene influences endothelial cell function: Interaction with selenium and fatty acids / L.K. Crosley, S. Bashir, F. Nicol [et al.] // *Molecular Nutrition and Food Research*. – 2013. – Vol. 57, Iss. 12. – P. 2185–2194.
302. The Use of Plant Protection Products in the European Union. Data 1992-2003 / Luxembourg, 2007. – 215 p.
303. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia / R. Schlemper [et al.] // *Gut*. – 2000. – Vol. 47. – P. 251-255.
304. Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death / C. Cereser, S. Boget, P. Parvaz, A. Revol // *Toxicology*. – 2001. – Vol. 163, Iss. 2–3. – P. 153–162.
305. Tomoyuki, T. Role of glutathione S-transferase in lens under oxidative stress / T. Tomoyuki // *Journal of Health Sciences*. – 2005. – Vol. 51, Iss. 3. – P.263–271.
306. Toor, H.K. Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of female albino rats / H.K. Toor, G.K. Sangha, K.S. Khera // *Pesticide Biochem. Physiol.* – 2013. – Vol. 105. – P. 1-4.
307. Townsend, D.M. The importance of glutathione in human disease / D.M. Townsend, K.D. Tew, H. Tapiero // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2003. – Vol. 57, Iss. 3–4. – P. 145–155.
308. Trace metal determination in total atmospheric deposition in rural and urban areas / S. Azimi, A. Ludwig, D.R. Thevenot, J.L. Colin // *Science of the Total Environment*. – 2003. – Vol. 308, Iss. 1–3. – P. 247–256.
309. Upasani, C.D. Effect of vitamin E, vitamin C and spirulina on the levels of membrane bound enzymes and lipids in some organs of rats exposed to lead / C.D. Upasani, R. Balaraman // *Indian Journal of Pharmacology*. – 2001. – Vol. 33, Iss. 3. – P. 185–191.

310. Ursini, F. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4 / F. Ursini, M. Maiorino // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2020. – Vol. 152. – P. 175–185.
311. Vaithinathan, S. Methoxychlor-induced alteration in the levels of hsp70 and clusterin is accompanied with oxidative stress in adult rat testes / S. Vaithinathan, B. Saradha, P.P. Mathur // *J. Biochem. Mole. Toxicol.* – 2009. – Vol. 23. – P. 29-35.
312. Vann, D. Ecology and conservation of the human species / D. Vann // *Med. J. Aust.* 2007. - Vol.2, N4. - P.203.
313. Viveros, Diana. Developments and Challenges in the Struggle Against Agrochemicals in Paraguay / Diana Viveros // *Environmental Justice*. - April 2012. – N. 5 (2). – P. 98-99.
314. Waqas, M. Puerarin enhance vascular proliferation and halt apoptosis in thiram-induced avian tibial dyschondroplasia by regulating HIF-1 α , TIMP-3 and BCL-2 expressions / M. Waqas, H. Qamar, J. Zhang, W. Yao, A. Li, Y. Wang, M. Iqbal, K. Mehmood, X. Jiang, J. Li // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2020. – Vol. 190. – Iss. 110126.
315. Werf, H.van der. Assessing in the impact of pesticides on the environment / H. van der Werf // *Agric. Ecosyst. Environ.* – 1996. – Vol. 60, N 2/3. – P. 81-96/
316. Wester, R.C. In vivo percutaneous absorption and decontamination of pesticides in humans / R.C. Wester, H.I. Maibach // *J. Toxicol. Environ. Health*. – 1985. – Vol. 16. – P. 25-37.
317. Winterbourn, C.C. Reconciling the Chemistry and Biology of Reactive Oxygen Species / C.C. Winterbourn // *Nature Chemical Biology*. – 2008. – Vol. 4, Iss. 5. – P. 278–286.
318. Wu, B. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery / B. Wu, D. Dong // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2012. – Vol. 33, Iss. 12. – P. 656–668.
319. Yang, M.S. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress /

- M.S. Yang, H.W. Chan, L.C. Yu // *Toxicology*. – 2006. – Vol. 226, Iss. 2–3. – P.126–130.
320. Zeise, L. Addressing human variability in next-generation human health risk assessments of environmental chemicals / L. Zeise, F.Y. Bois, W.A. Chiu // *Environ. Health Perspectives*. – 2013. – Vol. 121, N 1. – P. 23-29.
321. Zelko, I.N. Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) Gene Structures, Evolution, and Expression / I.N. Zelko, T.J. Mariani, R.J. Folz // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2002. – Vol. 33, Iss. 3. – P. 337–349.