

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
В. А. Кратасюк

« _____ » _____ 20__ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Активность про- и антиоксидантов у лошадей до и после физической нагрузки

Научный руководитель

д.б.н., доцент О. А. Коленчукова

Выпускник

И.С.Шевелева

Красноярск 2018

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Активность про- и антиоксидантов у лошадей до и после физической нагрузки» содержит 38 страниц текстового документа, 33 использованных источников.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ГРАНУЛОЦИТЫ, ФАГОЦИТОЗ, ЛОШАДИ, СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ КИСЛОРОДА.

Цель работы: изучить оценку активности оксидантов и антиоксидантов у спортивных лошадей при интенсивных нагрузках в динамике.

Проводились исследования физиологического состояния лошадей на различных этапах тренировочно-соревновательной нагрузки.

В ходе исследования было обнаружено, что в период интенсивной физической работы лошади подвергаются оксидантному стрессу.

Содержание

СОДЕРЖАНИЕ	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1 Хемилюминесценция	5
1.2 Свободные радикалы	9
1.3 Характеристика нейтрофильных гранулоцит	10
1.4 Фагоцитоз	14
1.5 Физиологическое состояние крови лошадей.....	21
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	24
2.1 Объекты исследования.....	24
2.2 Методы исследования.....	24
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	27
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	34
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	35

ВВЕДЕНИЕ

В соревновательно-тренировочный период спортивные лошади подвержены значительным физическим нагрузкам, которые иногда могут привести к различным функциональным расстройствам и развитию определенных патологий.

Для возможности профилактики и коррекции экстремальной физической нагрузки животных необходимо использование новых эффективных методов, к которым относятся биофизические методы исследования ферментативной активности. Именно биофизические методы дают возможность комплексно оценить физиологическое состояние животных и сделать вывод о наличии или отсутствии в организме глубоких метаболических сдвигов. Также необходимо изучить адаптационные процессы к физическим нагрузкам различного объема и интенсивности, оценить уровень тренированности и определить факторы, лимитирующие работоспособность спортивных лошадей. Из-за отсутствия комплексных методик на сегодняшний день остается актуальным исследование особенностей метаболических процессов у спортивных лошадей на разных этапах соревновательно-тренировочной деятельности.

Важнейшим звеном адаптационной перестройки организма является уровень его функциональных возможностей. Одним из критериев адаптационных возможностей является активность работы системы антиоксидантной защиты (АОЗ), обезвреживающей свободные радикалы. В настоящее время большое внимание уделяется исследованию влияния свободных радикалов на организм животных, которые оказывают обширное цитотоксическое воздействие, разрушая генетический аппарат клетки. При этом нарушается синтез белка и повреждается липидная мембрана клетки. Изменения метаболических процессов организма под влиянием стресса, отражаются на составе биологических жидкостей организма. [30,32] Исследование метаболических изменений под воздействием стрессоров позволит создать простой в использовании высокотехнологичный инструмент

для индивидуализированного формирования схем, контроля адаптации организма к стрессовым ситуациям.

Таким образом, целью исследования является изучение оценки активности прооксидантов, оксидантов и антиоксидантов у спортивных лошадей при интенсивных физических нагрузках в динамике.

Задачи:

1. Исследовать физиологическое состояние лошадей (ЧСС и частота дыхательных движений) при интенсивных физических нагрузках в динамике.
2. Исследовать активность прооксидантов (НАДФН-оксидаза) у лошадей при интенсивных физических нагрузках в динамике.
3. Исследовать активность оксидантов у лошадей при интенсивных физических нагрузках в динамике.
4. Исследовать активность антиоксидантов (каталаза) у лошадей при интенсивных физических нагрузках в динамике.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Хемилюминесценция

Хемилюминесценция (ХЛ) – свечение, сопровождающее химические реакции. Хемилюминесценция обусловлена, реакциями экзотермического типа. ХЛ протекает в три стадии:

1) Восстановление одного из участников реакции (присоединение электрона) и окисление второго (отрыв электрона), что приводит к запасанию химической энергии в системе, которая позднее выделится в виде фотона.

2) Перенос электрона (окислительно-восстановительная реакция) на один из более высоких энергетических уровней и образование продукта реакции в электронно-возбужденном состоянии.

3) Высвечивание фотона при переходе молекулы из электронно-возбужденного в основное состояние (люминесценция). Обычно химические реакции, сопровождающиеся свечением, протекают через целый ряд промежуточных стадий, но основные этапы образования и испускания энергии сходны [2].

ХЛ метод позволяет регистрировать короткоживущие свободные радикалы, которые можно разделить на четыре группы:

- а) СР липидов,
- б) свободные радикалы (СР) активных форм кислорода,
- в) СР естественных антиоксидантов»
- г) СР, осуществляющие ферментативное дыхание в митохондриях

Свободные радикалы хемилюминесценции клеток[3].

Живые клетки - фагоциты (к ним относятся тканевые макрофаги, а также моноциты и гранулоциты крови) сами формируют при стимулировании активные формы кислорода. При этом отмечается хемилюминесценция, особенно выраженная при наличии люцигенина (или люминола).

Уровень ХЛ при фагоцитозе определяет интенсивность "респираторного взрыва" в клетках с продукцией активных форм кислорода, выражающих бактерицидное действие. Первичными метаболитами активированного

кислорода являются синглетный кислород (1O_2), супероксидный анион-радикал (O_2^{\bullet}), гидроксильный радикал (OH^{\bullet}), перекись водорода (H_2O_2). В качестве основных вторичных метаболитов необходимо отметить гипохлорную кислоту ($HOCl$), хлорамины и продукты перекисного окисления липидов. Взаимодействие первичных и вторичных оксидантов с высоким энергетическим потенциалом образуют динамический спектр молекул, которые прямо или косвенно включаются в реакции фагоцитов. При этом, Взаимодействие люминесцирующих посредников (люцигенин, люминол и др.) с высокоэнергетическими оксидантами служит источником перехода в электронно-возбужденное состояние, выход из которого сопровождается испусканием кванта света. Регистрация светоизлучения ХЛ реакции производится на хемилюминометрах отечественного или зарубежного производства.

Виды хемилюминесценции:

– Спонтанная - свечение, возникающее без вмешательства извне

- 1) Митогенетические (190-320 нм)
- 2) Метаболическое (360-1200 нм)
- 3) Физиологическое свечение (400-700 нм)

– Индуцированная возникает при воздействии различных факторов

- 1) Фотохемилюминесценция
- 2) Радиолюминесценция
- 3) Электролюминесценция
- 4) Триболюминесценция
- 5) Термолюминесценция

Интенсивность ХЛ не зависит от реакционной способности радикалов, т.к. при увеличении реактивности радикалов одновременно и в той же мере снижается стационарная концентрация радикалов, их производство остается постоянным, а вместе с тем не происходит и изменения интенсивности ХЛ. Иными словами, метод ХЛ регистрирует даже самые активные радикалы, концентрация которых в изучаемой системе может быть исчезающе мала, и в

этом – его уникальность и преимущество перед другими методами обнаружения радикалов в химических и биологических системах.

Собственная хемилюминесценция (СХЛ) имеет два недостатка. Во-первых, из-за низкой интенсивности свечения измерение СХЛ требует не только применения весьма чувствительной, но и большого количества материала для анализа, что для биологии и медицины весьма нежелательно, а часто просто невозможно. Во-вторых, метод мало специфичен, т.к. за сверхслабое свечение в биологических объектах могут отвечать реакции многих активных частиц: радикалов и пероксидов [5].

Значительное распространение получило однако измерение хемилюминесценции в присутствии определенных соединений, получивших название активаторов ХЛ (по-английски, enhancers – усилителей). По механизму действия активаторы распадаются на две четко различающиеся группы, которые можно назвать химическими и физическими активаторами.

Химические активаторы ХЛ – это соединения, вступающие в реакции с АФК или органическими свободными радикалами, в ходе которых образуются молекулы продуктов в возбужденном электронном состоянии. Наблюдаемое при этом свечение связано с переходом молекул в основное состояние, что приводит к высвечиванию фотонов:

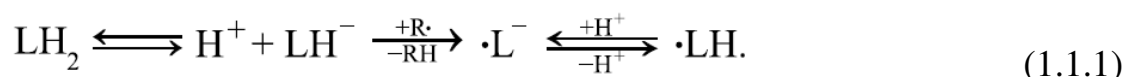


Хорошо известными представителями таких активаторов могут служить люминол (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион, гидразид 3-аминофталевой кислоты) илюцигенин (динитрат 10,10'-диметил-9,9'-биакридиния) [6].

Люминол-зависимая хемилюминесценция (ЛХЛ) клеток. Измерение люминол-зависимой ХЛ клеток крови широко используется для изучения функционального состояния фагоцитарного звена иммунитета. Появление и взаимодействие чужеродного материала с фагоцитирующей клеткой запускает сложный каскад физиологических и метаболических процессов, начало которого – взаимодействие рецепторов на поверхности клетки с разного рода

лигандами, включая иммунные комплексы, а конец – образование супероксидных радикалов при переносе электрона с НАДФН на O₂. Метаболизм этих радикалов, разрушение бактериальной клетки и запуск биосинтеза множества физиологически активных соединений в клетке-фагоците. ЛХЛ вызывается окислением люминола активными формами кислорода и хлора и взаимодействием окисленных форм люминола с супероксидным радикалом или пероксидом водорода [7].

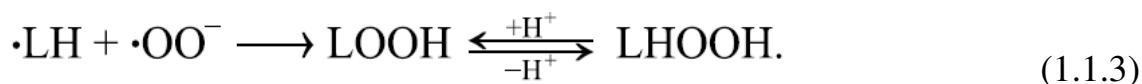
В упрощенном виде процесс протекает в три этапа. Первая стадия – это окисление люминола каким-либо сильным оксидантом, например, радикалом или окисленной формой металла переменной валентности:



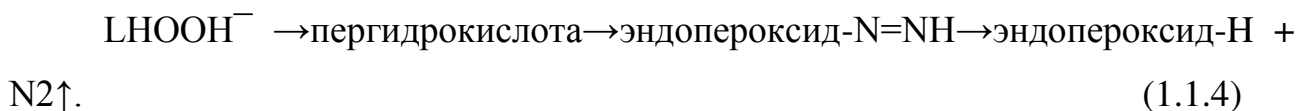
Образовавшийся окисленный радикал люминола может вступать в различные реакции, которые не приведут к ХЛ: взаимодействовать с другим радикалом люминола или с одноэлектронным окислителем R·, подвергаться дальнейшему окислению или взаимодействовать с молекулой антиоксиданта InH:



Второй и весьма важный этап в развитии ХЛ- реакции – появление ключевого гидропероксидного продукта (4-гидроперокси-1-окси-5-аминофалазин-4-олата), которое в биохимических системах обычно происходит при взаимодействии радикала люминола с супероксидом:



Собственно ХЛ-реакция начинается с превращения гидропероксида (LOOH) в соединение, содержащее эндопероксидную химическую группу (2,3-перокси-ди [гидрокси-метиленил] фениламин):



На заключительном этапе в эндопероксидной группе разрывается связь между атомами кислорода и образуется молекула монопротонированной аминифталевой кислоты в электронно-возбужденном состоянии с последующим испусканием кванта света.

1.2 Свободные радикалы

Свободные радикалы (СР) – это молекулярные частицы, на внешней орбитали которых имеются неспаренные электроны. СР обладают высокой реакционной способностью, и их стационарная концентрация в клетках всегда очень мала. Изучение СР и реакций, в которых они участвуют, ведется методами ЭПР, хемиллюминесценции и другими анализами. Активные формы кислорода, окись азота, липидные радикалы, радикалы антиоксидантов и ксенобиотиков постоянно образуются и исчезают в живых клетках. УФ-излучение и облучение ионизирующей радиацией тоже приводят к образованию свободных радикалов молекул-мишеней. Драматические последствия для мембранных структур клетки может иметь реакция перекисного окисления липидов. Скорость ее протекания зависит от ионов двухвалентного железа, которые участвуют в образовании радикала гидроксила, инициирующего цепное окисление, и в разветвлении цепей окисления. Повреждающее действие цепного окисления липидов на биологические мембраны вызвано окислением тиоловых групп белков, увеличением ионной проницаемости мембран и снижением электрической прочности липидного слоя мембраны, что приводит к разрушению мембраны

электрическим полем. Живая клетка выработала систему защиты от повреждения СР. Вещества, тормозящие реакции с участием СР, локализуются и в водной среде, и в липидной фазе клеточных структур. В органических молекулах электроны на внешней электронной оболочке располагаются парами. СР отличаются от обычных молекул тем, что у них на внешней электронной оболочке имеется неспаренный электрон. Это делает радикалы химически активными, поскольку радикал стремится либо вернуть себе недостающий электрон, отняв его от окружающих молекул, либо отдать лишний электрон. В обоих случаях молекула-мишень модифицируется.

Радикалы обладают высокой реакционной способностью, и изучать их обычными химическими методами невозможно. Большинство радикалов, образующихся в организме, можно разделить на природные и чужеродные. Природные радикалы в свою очередь подразделяются на первичные, вторичные и третичные (радикалы антиоксидантов). Образование первичных радикалов осуществляется при участии определенных ферментных систем. Эти радикалы выполняют полезные функции. Из первичного радикала – супер-оксида, а также в результате других реакций в организме могут образоваться активные молекулярные соединения: перекись водорода, гипохлорит и гидроперекиси липидов. Под действием ионов металлов переменной валентности, с первую очередь ионов Fe^{2+} , из этих веществ образуются вторичные свободные радикалы, такие, как радикал гидроксила и радикалы липидов, которые оказывают разрушительное действие на клеточные структуры.

1.3 Характеристика нейтрофильных гранулоцитов

Лейкоциты, или белые кровяные клетки, периферической крови человека и позвоночных разнородны по функциональным и морфологическим показателям.

Лейкоциты подразделяют на две большие группы: незернистые лейкоциты (агранулоциты) и зернистые лейкоциты (или гранулоциты). Для

зернистых лейкоцитов характерно наличие в цитоплазме сегментированных ядер и специфической зернистости. Для незернистых лейкоцитов характерно отсутствие цитоплазме сегментированных ядер и специфической зернистости. Подразделяются на моноциты и лимфоциты, имеющие разные по фенотипические свойства, генотипические признаки и биологическую роль.

Нейтрофильные гранулоциты имеют сферическую форму. Нейтрофильных гранулоцитов больше, чем других лейкоцитов содержание в крови взрослого человека достигается 65—75% от общего числа лейкоцитов, 3-5% нейтрофилов содержат ядро. Юные формы нейтрофилов имеют бобовидное ядро и в периферической крови содержится около 0-0,5% [14].

Ядра нейтрофилов содержат плотный хроматин, имеют сегментированное ядро, состоящие из 2-3 долек, соединенных тонкими перемычками.

Нейтрофильные гранулоциты различают два основных типа зернистости в зависимости от химического состава и строения на азурофильную (первичные гранулы) и специфическую (вторичные гранулы). Специфическая зернистость превышает 80% всех гранул. В ней выявляется щелочная мурамидаза, цитохромоксидаза, аминопептидаза, фосфатаза, пероксидаза, а также липиды, гликоген и др. Общее количество азурофильных гранул составляет 10-20%, они представляют собой лизосомы с характерным набором гидролитических ферментов [15].

Нейтрофилы обладают высокой фагоцитарной способностью и подвижностью, способны к хемотаксису. Они поглощают бактерии и другие частицы, которые перевариваются под действием гидролитических ферментов. Жизненный цикл нейтрофилов достигает до 8 сут. В 8-12 ч находятся кровеносном русле, а затем выходят в соединительную ткань, где выполняют свои функции [16].

Длительность пребывания нейтрофильных гранулоцитов в периферической крови составляет приблизительно 6-8 ч, это объясняет их высокую производительность - 2.5 биллиона клеток в час. Нейтрофилы, как и

другие лейкоциты образуются из общей полипотентной стволовой клетки в костном мозгу.

Время дифференцировки нейтрофильных гранулоцитов от клетки-предшественника до зрелой клетки в зависимости от степени активности процесса составляет от 7 до 10 дней [17].

Формирование нейтрофилов в костном мозгу связано с динамикой морфологических изменений клеток: появление специфической нейтрофильной зернистости, концентрация его у оболочки клетки и конденсация хроматина, исчезновение ядрышек, утрата базофилии цитоплазмы, сегментация ядра, постепенное уменьшение размеров ядра с увеличением доли цитоплазмы.

Для процесса созревания нейтрофильный гранулоцитов необходимо регуляция основных условий: дифференцировка этих клеток в зрелые под воздействием различных факторов роста и поддержание достаточного количества стволовых клеток [18].

Характерным признаком нейтрофилов является активное перемещение. Чувствителен к действию различных модуляторов миграционной функции и движение нейтрофильных гранулоцитов намного быстрее других лейкоцитов. Нейтрофил при спонтанной миграции двигается беспорядочно, периодически меняя вектор движения. Псевдоподии выбрасываемые клеткой иногда не совпадают с осью уже начавшегося перемещения вызывают отклонение миграционного маршрута. Сократительные белки, подобные, но не идентичные миозину и актину мышечных клеток, являются структурной миграционной функцией. Собраны в микрофиламенты, которые соединяют при активации с образованием сократительных волокон, двигательного аппарата нейтрофила и располагаются по клеточной периферии.

Хемотаксис отражает способность клетки двигаться в сторону нахождения стимулирующих веществ, именуемых хемоаттрактантов или хемо(cito)токсинами. Направление движения определяется градиентом концентрации хемоаттрактантов. Хемотаксис является предстадией фагоцитоза,

поскольку он необходим для сближения нейтрофила с фагоцитируемым объектом [19].

Разрушение, проникших в организм инфекционных частиц - функция зрелых нейтрофилов. Осуществляя ее они тесно взаимодействуют с макрофагами, Т- и В-лимфоцитами. Нейтрофилы секретируют вещества, способствуют регенерации тканей, секретируя стимулирующие регенерацию вещества, удаляя из них поврежденные клетки, обладающие бактерицидными эффектами.

Часть нейтрофильных гранул, дают положительную окраску на фермент миелопероксидазу, представлены лизосомами, включающими многочисленные энзимы: катионные белки, нарушающие рост микроорганизмов и дыхание; лизоцим, разрушающий стенку бактерий; кислые гидролазы и нейтрофильные протеазы, позволяющие нейтрофилам легко усваивать фагоцитированные частицы [20].

Нейтрофилы осуществляют свои функции, благодаря способности быстро мигрировать и собираться в поврежденном и инфицированном участках организма, фагоцитировать, т.е. поглощать и разрушать в фагоцитарных вакуолях внутри клетки захватывать бактерии и поврежденные клетки. Хорошо развитый аппарат движения связана со способностью миграции.

Появлением в тканях вазоактивных и хемотаксических факторов характеризует выбор направления движения инфицированным и воспаленным тканям. Вазоактивные факторы увеличивают проницаемость капилляров, что содействует миграции нейтрофилов в ткань. Хемотаксические факторы образуют лигандрецепторный комплекс взаимодействия с рецепторами на поверхности нейтрофильных гранулоцитов, определяющий движение нейтрофилов к пораженному участку. Лейкотриены обладают сильным хемотаксическим эффектом, производные метаболизма арахидоновой кислоты в мембране клеток. Они секретируются активированными макрофагами и Т-лимфоцитами после влияния на них бактериальных веществ. Эндотоксины также секретируют хемоаттрактанты. Основными хемотаксическими факторами

являются продукты активации комплемента — фрагменты его молекул C2a и C5a. Некоторые из этих факторов, особенно C, функционируют как опсонины, т.е. вещества, содействуют фагоцитозу бактерий [21].

Реакций, в которых участвуют нейтрофилы, совершается в тканях. Поэтому адгезивность, характеризующая способность клеток задерживаться и прикрепляться на определенных субстратах, имеет особое значение при оценке функционального потенциала нейтрофильного гранулоцита [22].

Нейтрофильные гранулоциты способны осуществлять киллинг микроорганизмов с помощью двух принципиально различных механизмов: кислородозависимого и кислороднезависимого.

К кислородзависимому пути относят «респираторный взрыв», который формируются при взаимодействии нейтрофилов с объектами фагоцитоза. Кислородзависимый механизм не является системой жизнеобеспечения нейтрофила, который хорошо переносит гипоксию и нормально выполняет ряд функций (например, поглощение) в условиях анаэробноза. «Респираторный взрыв» относится к ряду метаболических процессов, имеющих место при воздействии нейтрофилов: увеличение потребления кислорода и усиление окисления глюкозы в пентозофосфатном цикле (ПФП), и как результат этого — продукция активных форм кислорода, обеспечивающих цитотоксический эффект и обладающих бактерицидным действием. На регистрацию интенсивности «респираторного взрыва» основаны многие клинко-диагностические методы оценки состояния организма, в частности и хемиллюминесцентный анализ[23].

1.4 Фагоцитоз

И. И. Мечников первым открыл защитную функцию макрофагов за это получил Нобелевскую премию открыв явление фагоцитоза. Наиболее древней филогенетически иммунной реакцией является фагоцитоз. Фагоцитоз - первый ответ иммунной системы на проникновение чужеродных антигенов, которые

могут проникать в организм в виде вирусных частиц или бактериальных клеток, а также в составе высокомолекулярных полисахаридов или белков.

В процессе фагоцитоза клетки захватывают и переваривают твёрдые частицы. Фагоцитоз – один из видов эндоцитоза. У некоторых клеток он используется для получения полезных веществ, и для одноклеточных организмов подобен питанию. У многоклеточных организмов фагоцитоз выполняет функцию удаления отходов и патогенов.

Моноциты и макрофаги — древние клетки иммунной системы. Моноциты - циркулирующие в периферической крови предшественники макрофагов, функции которых разнообразны и не исчерпываются потребностями иммунной защиты организма.

Пищеварительная функция – основное эволюционное формирование фагоцитоза как иммунологического феномена. Предковые одноклеточные организмы поедают и переваривают чужеродные частицы внешней среды с целью питания. Такой тип питания сохранился у современных губок, кишечнополостных и протозоа. Прокариоты, среди которых встречается много патогенных микроорганизмов и неструктурированные вещества являлись источником питания. Фагоцитарная функция макрофагов-амебоцитов сохранилась в эволюции от одноклеточных до высших многоклеточных, включая млекопитающих, несмотря на усовершенствование в филогенезе механизмов иммунной защиты. Механизм фагоцитоза включает 8 последовательных фаз (Таблица 1).

Таблица 1– Стадии фагоцитоза

Стадия	Событие	Факторы клетки-мишени	Факторы фагоцита
Хемотаксис	Направленное движение фагоцита к объекту	Хемотаксины: бактериальные, C5a, C3a, хемокины, лейкотриены и др.	Рецепторы хемотаксических факторов, цитоскелет
Адгезия	Установление контакта	Опсонины (антитела,	Молекулы адгезии

	(прилипание фагоцита к объекту)	C3b, фибронектин), молекулы адгезии	(интегрины и др.), рецепторы (FcγR, C3R и др.)
Активация мембраны	Подготовка к поглощению	Интегрины, опсонины, защитные факторы микроорганизмов	Белки G, Ca ²⁺ , сигнальные факторы, киназы, цитоскелет
Погружение	Обволакивание объекта	Защитные факторы, препятствующие фагоцитозу	Цитоскелет (микрофиламенты)
Образование фагосомы	Замыкание мембраны и погружение	Не установлены	Цитоскелет (микротрубочки, микрофиламенты), мембрана
Образование фаголизосомы	Слияние фагосомы и лизосомы	Блокирующие агенты (подавляют слияние)	То же
Киллинг и переваривание	Гибель объекта и его переваривание	Факторы устойчивости	O ₂ - и NO-зависимые факторы, катионные белки, пептиды, ферменты, закисление
Выброс продуктов деградации	Выброс содержимого фаголизосомы из клетки	Не установлены	Цитоскелет, мембрана

Инициатором процесса служит образование на поверхности клетки комплекса антиген-антитело. Опсонизация обеспечивается присутствием небольшого количества в организме молекул антител («нормальные антитела»). Антитела, находящиеся на поверхности чужеродной клетки, присоединяют к ним белков системы комплекса и стимулируют активацию. Образующаяся система действует как промотор следующих стадий фагоцитоза, стимулирует прямо или через посредство других клеток образование веществ, усиливающих эффект опсонизации чужеродной клетки.

Хемотаксис. Чужеродные клетки (неопсонизированные или опсонизированные) отправляют хемотаксические сигналы в окружающую среду, фагоцит начинает двигаться в этом направлении. Целый ряд веществ, также продукты метаболизма микроорганизмов рассматривается в качестве хемотаксических факторов. Комплекс антитело-антиген является начальным фактором, высокую специфичность суммарного хемотаксического сигнала. Фагоцитирующие элементы первыми приходят на сигнал, которые, возбуждая другие иммунокомпетентные клетки, активируют их к выработке медиаторов, повышающий хемотаксис. Далее хемотаксический потенциал увеличивается за счет новообразовавшихся антител, формирования комплексов антитело-антиген, а также ряда факторов, образующихся при разрушении макрофагами тканей и сосудов в воспалительном очаге. Сохранение в нем активной работы за счет поступления новых порций иммунокомпетентных клеток гарантируют хемотаксические сигналы второго порядка (образованного очага воспаления). Макрофаг, достигнув очага воспаления, останавливается под влиянием фактора торможения миграции лейкоцитов, вырабатываемого Т—лимфоцитами—хелперами. Исчезновение в очаге воспаления чужеродных антигенов, начало процессов регенерации ведет к быстрому уменьшению появлению продуктов и хемотаксического стимула, представляющих собой отрицательный хемотаксический сигнал. Оставшиеся жизнеспособные фагоциты рассеиваются по всей ткани, а новообразовавшихся фагоциты перестают мигрировать в воспалительный очаг [23].

Адгезия. Процесс адгезии включает две фазы: узнавание чужеродного (специфический процесс) и собственно адгезию или присоединение (неспецифический процесс). При отсутствии предварительного узнавания чужеродных клеток адгезия фагоцитирующей клетки к объекту фагоцитоза происходит крайне медленно.

Захват (собственно фагоцитоз). Специфические компоненты иммунной системы выполняют огромную роль в осуществлении захвата фагоцитоза. Захват неопсонизированных частиц идет медленно, причем часть из них не

фагоцитируется. Иммуноглобулины - сильные опсоины. Плазматическая мембрана макрофага при помощи сформированных ею выпуклых складок захватывает объект и затягивает его. Фагосомой называется сформировавшаяся маленькая вакуоль. Далее фагосома отрывается от поверхности мембраны и перемещается в цитоплазму.

Киллинг (убийство). Процесс киллинга осуществляется в фагосоме, когда захваченная чужеродная клетка погибает. Для выполнения киллинга макрофаг секретирует и продуцирует в фагосому реакционноспособные производные кислорода [24].

Переваривание. Переваривание убитого и захваченного материала - последний этап фагоцитоза. Фагосома, содержит объект фагоцитоза, соединяется лизосомы. В состав лизосомы входит более 25 различных ферментов (большое количество гидролитических энзимов). В фагосоме происходит метаболический взрыв (активация всех ферментов), в результате этого фагоцитируемая частица переваривается. Антигенная активность существенно возрастает потому что часть молекул антигена при этом разрушается не полностью. Огромную роль для индукции лимфоцитами специфического иммунного ответа - фагосома с остаточным антигеном выбрасывается на поверхность клетки, освобождая иммуногенный антиген[25].

Характеризуя кислороднезависимый механизм реализации антимикробной реактивности моноцитов, следует отметить цитоплазматические гранулы, которые содержат дополнительные антимикробные агенты, которые действуют в фаголизосомах без присутствия кислорода. В настоящее время хорошо охарактеризованы три компонента гранул: В/РІ (бактерицидный/повышающий проницаемость белок), CLCP (химотрипсиноподобный катионный белок; катепсин-G) и дефенсины.

В/РІ – белок азурофильных гранул, обладающий бактерицидной активностью в отношении грамотрицательных бактерий. Причиной потери жизнеспособности бактерий является повышение их проницаемости путем деградации пептидогликанов и фосфолипидов. Избирательность по отношению

к грамотрицательным бактериям определяется взаимодействием с ЛПС. CLCP – также содержится в азурофильных гранулах, включает в себя три катионных белка с перекрестной иммунологической реактивностью, которые *in vitro* обладают антибактериальной и химотрипсиновой активностями. Дефенсины – это группа низкомолекулярных пептидов, богатых цистеином. Эти пептиды проявляют активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов и вирусов. Дефенсины нейтрофилов человека подвергают киллингу только метаболически активные бактерии и индуцируют потерю целостности их внешней и внутренней мембран.

Кислородзависимый путь – «респираторный взрыв», который относится к серии метаболических процессов, имеющих место при стимуляции фагоцитоза, а именно: увеличение потребления кислорода и усиление окисления глюкозы в пентозофосфатном цикле (ПФП), и как результат этого – продукция активных форм кислорода, обладающих бактерицидным действием и обеспечивающих цитотоксический эффект. Именно на регистрации интенсивности «респираторного взрыва» основаны многие клинко-диагностические методы оценки состояния организма, в частности и хемилюминесцентный анализ. Катализирует респираторный взрыв мембраноассоциированная пиридиннуклеотидоксидаза за счет реакции окисления НАДФН, образующегося при окислении глюкозы, и восстановления молекулы кислорода до супероксидного аниона.

Первичными метаболитами активированного кислорода являются супероксидный анион-радикал (O_2^-), с которого берет начало весь каскад активных форм кислорода, перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (OH^-) и синглетный кислород (1O_2). В качестве основных вторичных метаболитов можно выделить гипохлорную кислоту ($HOCl^-$), хлорамины и продукты перекисного окисления липидов. Как первичные, так и вторичные оксиданты обладают мощным энергетическим потенциалом, а их взаимопревращения создают динамический спектр молекул, которые обеспечивают цитопатогенные эффекты моноцитов [26,27].

«Респираторный взрыв» обычно сопутствует фагоцитозу. Однако усиление клеточного «дыхания» и повышение активности ПФП наблюдается и при взаимодействии с крупными объектами, недоступными эндоцитозу, а также при стимуляции растворимыми агентами. В этих случаях моноциты выделяют оксиданты во внеклеточную среду, где они выполняют такие же функции, как внутри фагосомы.

Именно свободными радикалами кислорода обеспечивается механизм бактерицидного действия моноцитам. Полагают, что токсический эффект активных форм кислорода связан с деградацией ими гиалуроновой кислоты, коллагена базальных мембран и экстрацеллюлярного матрикса. Нарушение образования этих соединений основной причиной утраты резистентности к бактериальной инфекции при хронической гранулематозной болезни. Кислородозависимый механизм киллинга играет ведущую роль в защите против инфекций, вызванных бактериями, что отчетливо показано на примере перекиси водорода, как дезинфицирующего средства. Следует отметить, что высокая фагоцитарная активность не всегда коррелирует с повышенным уровнем продукции активных форм кислорода, в то время как бактерицидная активность клеток тесно связана с количеством внутрифагосомных высокоэнергетических оксидантов. Моноциты не способны к образованию интермедиатов кислорода, при нарушении окислительного метаболизма.

Образование фагосомы начинается с взаимодействия специфических рецепторов фагоцитов с бактерией или комплексом антиген - антитело. Рецепторы, расположенные в тех участках плазматической мембраны, где локализован особый белок клатрин, "узнают" компоненты комплемента, олигосахариды на поверхности микроорганизмов или Fc области комплекса антиген - антител. Активация рецепторов, передающих сигнал в клетку с участием инозитолфосфатной системы, инициирует процессы, определяющие фагоцитарный ответ клетки. Он включает в себя формирование фагосомы, слияние её с лизосомой, образование фаголизосомы, активацию кислородзависимых бактерицидных механизмов уничтожения микробов и/или

выработку клетками токсичного для микробов оксида азота, а также действие кислороднезависимых механизмов уничтожения микроорганизмов [28].

Изучение метаболических каналов, которые выводят моноциты на «респираторный взрыв», сфокусировалось, вокруг механизмов, окисляющих и восстанавливающих НАДФ. Таким образом, превращения в системе НАДФН-НАДФ сопрягают два альтернативных механизма: аппарат окисления (его суммарно обозначают как НАДФН-оксидаза) и аппарат восстановления НАДФ – им служит ПФП, где попутно с другими задачами решается снабжение клетки молекулами НАДФН. Она структурно или функционально сопряжена с рецепторами, распознающими внешние сигналы, и активизируется при связывании лигандов на фоне общей перестройки мембран. Центральное место в фосфорилировании НАДФН-оксидазы принадлежит протеинкиназе С (ПК-С), которая активируется в системе Ca^{2+} -фосфолипидзависимых реакций. Подключение ПК-С — не единственный способ инициации «респираторного взрыва» моноцитов. Примером служит стимуляция Ca^{2+} -ионофорами, когда фосфорилирование НАДФН-оксидазы обеспечивается кальмодулином, активируемым потоком Ca^{2+} из внешней среды, либо из внутриклеточных резервов. Установлено, что моноциты могут не реагировать на прямую активацию ПК-С (латекс), но сохранять чувствительность к другим стимуляторам (опсонизированный зимозан), которые способны активировать НАДФН-оксидазу, минуя С-протеинкиназный комплекс. Иными словами, развитие метаболической перестройки моноцита находится под контролем нескольких механизмов, которые лишь частично стыкуются между собой, определяя возможность дифференцированного воздействия на кислородзависимые реакции через усиление либо ослабление различных медиаторных узлов клетки.

1.5 Физиологическое состояние крови лошадей

В данной таблице представлены нормы содержания морфологических показателей в крови лошадей.

Гематологические показатели лошадей

Показатель	Единицы	Содержание в крови
Эритроциты	мм ³ /млн	6,0-9,0
Лейкоциты	мм ³ /тыс	4,0-6,5
Тромбоциты	мм ³ /тыс	350
Гемоглобин	г/л	120-170
СОЭ	мм/ч	54-71
Гематокрит	%	35-45

Эритроциты лошадей в процессе эволюции специфически изменились. Данные клетки не содержат ядер, сравнительно крупные образования, их диаметр равен 4,5-5,8 мкм. В 1 мм³ крови здоровых лошадей содержится 6,0-9,0 млн эритроцитов. Продолжительность жизни данных клеток составляет 100-120 суток, ежесекундно образуется около 2,5 млн эритроцитов и столько же разрушается. Скорость образования эритроцитов увеличивается под действием любого фактора, приводящего к недостатку кислорода в тканях. После интенсивной физической нагрузки количество эритроцитов в крови лошадей возрастает.

До 90% сухой массы эритроцита приходится на долю дыхательного пигмента гемоглобина, обуславливающим красный цвет крови и заполняющим всю цитоплазму. Гемоглобин это сложный белок. Поступающий в кровеносные капилляры кислород присоединяется к гемоглобину в легких, а затем отторгаются от него в клетках тканей. При напряженной физической работе поглощение кислорода тканями возрастает. Гемоглобин синтезируется в молодых формах эритроцитов костного мозга непрерывно, что обеспечивает постоянное обновление в организме животного. Ежесекундно образуется около 650×10^{12} молекул гемоглобина. Содержание гемоглобина в крови лошадей зависит от пола, возраста и состояния здоровья. У взрослой здоровой лошади этот показатель составляет 120-170 г/л. Лейкоциты – белые кровяные клетки с ядром, главная функция которых заключается в иммунной реакции организма на инородные тела. Лейкоциты крупнее эритроцитов. Их содержание в крови здоровых взрослых лошадей составляет 4,0-6,5 мм³/тыс.

Гематокрит – процентное отображение части объема крови, приходящейся на все форменные элементы в ней. Значение гематокрита у взрослых здоровых лошадей составляет 35-45%. Соотношение форменных элементов крови и плазмы изменяется в зависимости от возраста, вида, функционального состояния породных особенностей и интенсивности физических нагрузок во время тренировок. Наибольшей изменчивостью характеризуются концентрационные показатели крови у жеребят до 6 месяцев.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

- Объектами являлись нейтрофильные гранулоциты и сыворотка крови выделенная у 12 спортивных лошадей в возрасте от 4 до 18 лет до и после физической нагрузки. В данной работе исследования проводились в 3 этапа.
- 1 - этап минимальной физической нагрузки;
- 2 - этап средней физической нагрузки;
- 3 - этап максимальной физической нагрузки во время соревнований.

Кровь отбирали перед тренировочной нагрузкой и сразу после. Также регистрировались количество дыхательных движений и частота сердечных сокращений до и после нагрузки. ЧСС определялось параллельно при ЭКГ. Количество дыхательных движений определялись визуально по движению грудной клетки и движению воздуха.

Исследования представленные в бакалаврской работе проводились в лабораториях СФУ ИФБиТ, НИИ МПС и КГАУ институт ветеринарной медицины.

2.2 Методы исследования

2.1. Первичные и вторичные радикалы кислорода оценивали с помощью люцигенин- и люминол-зависимой хемилюминесценции.

2.2. Оценка спонтанной и индуцированной хемилюминесценции.

Лейкоцитарный супернатант дважды отмывают в растворе Хенкса без фенолового красного по 10 мин при 500g. Супернатант сливают, оставшиеся нейтрофильные гранулоциты разводят в 1 мл Хенкса и получают взвесь. Для подсчета клеток в планшет добавляют 40 мкл уксусной кислоты и 10 мкл лейкоцитарной взвеси и подсчитывают количество нейтрофильных гранулоцитов в камере Горяева в 5 больших квадратах по диагонали. Количество клеток

определяют по формуле $(X_1 * 11 * 1000) / 0,02 = (X_2 / 2000000) - 1$ - количество Хенкса необходимо добавить к 1 мл лейкоцитарной суспензии, где X_1 - суммарное количество клеток в 5 квадратах, X_2 -количество нейтрофилов в 1 мл суспензии (необходимое количество клеток $2 * 10^6$). Для проведения хемилюминесцентного анализа используют следующие реактивы: донорскую сыворотку (группа крови АВ, резус-фактор отрицательный), раствор Хенкса (без фенолового красного), люминол или люцигенин в концентрации 100 мкг/мл. Готовят пробу: 200 мкл взвеси нейтрофильных гранулоцитов, 20 мкл донорской сыворотки, 240 мкл раствора Хенкса, 50 мкл люминола или люцигенина и 40 мкл зимозана. Хемилюминесцентный анализ проводят в 4 кюветах (в первых 2-х используем люминол; во вторые 2-е добавляют люцигенин). Спонтанная хемилюминесценция осуществляется без добавления индуктора, во вторую кювету добавляют зимозан и при помощи хемилюминесцентного анализатора, например «CL3604» в течение 90 мин. Регистрация результатов и управление хемилюминесцентным анализатором осуществляют через компьютер. Получают кривую хемилюминесценции. Определяют величину T_{max} , I_{max} , S_{max} для каждого показателя (спонтанная хемилюминесценция, зимозан-зависимая хемилюминесценция).

2.3. Третичные (антиоксиданты) радикалы оценивали с помощью люминол-Н₂О₂-зависимой хемилюминесценции.

В пробы сыворотки добавляли люминол и Н₂О₂. Хемилюминесцентное исследование проводили с использованием планшетного люменометра TriStar LB 941, производства Berthold, по следующей методике. 200 мкл слюны вводили в планшет, далее добавляли по 25 мкл люминола и вводили планшет в прибор. Прибор фиксировал фоновое свечение, через 16 и автоматически впрыскивал 25 мкл 3% Н₂О₂, которая являлась источником свободных радикалов. Измерение ХЛ проходило в течение 5 мин, в ходе чего получали график динамики свечения проб. Эксперимент проводился при

комнатной температуре. После окончания эксперимента пробы слюны хранились в замороженном виде.

2.4 Статистические методы исследования

По результатам исследования в пакете электронных таблиц MSExcel 7,0 была сформирована база данных, статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoftInc., 2004). Достоверность различий до и после физической нагрузки определяли по критерию Вилкоксона. ($p < 0,05$).

ГЛАВА 3.РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты первого этапа минимальной тренировочной нагрузки

Анализ первого этапа минимальной тренировочной нагрузки показал, увеличение таких физиологических параметров как частота сердечных сокращений и количество дыхательных движений после нагрузки, что является явными показателями испытываемой лошадьми нагрузки (рис. 1).

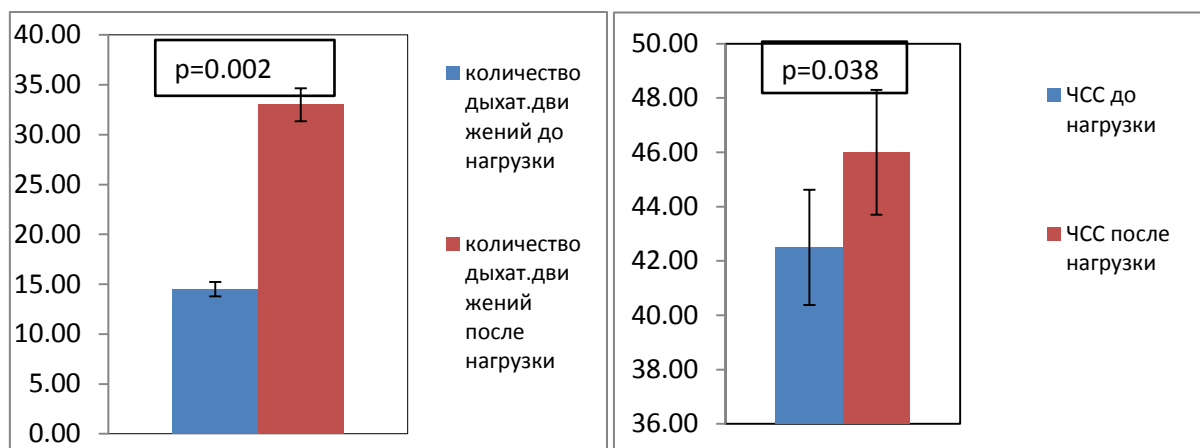


Рисунок 1 Изменение количества дыхательных движений до и после тренировочной нагрузки

Оценка про- и оксидантного статуса проходила по исследованию кислородозависимого фагоцитоза нейтрофилов у лошадей. Было обнаружено статистически значимое повышение интенсивности и площади спонтанного люцигенин-и люминол- зависимого хемилюминесцентного свечения после интенсивных физических упражнений (рис.2 и 3 соответственно). Что может указывать на активизацию выработки первичных и вторичных радикалов кислорода при повышении нагрузки у лошадей.

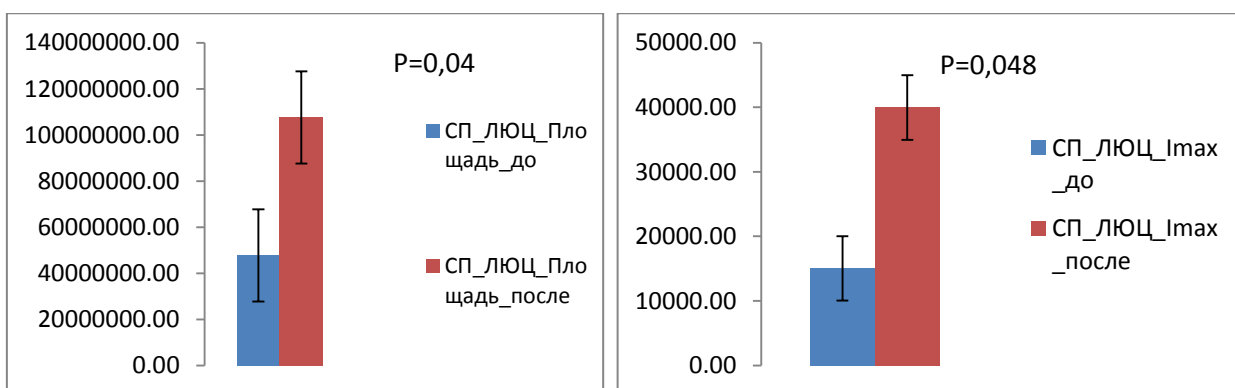


Рисунок 2 Изменение площади и интенсивности спонтанного люцигенин-зависимого хемилюминесцентного свечения до и после тренировочной нагрузки

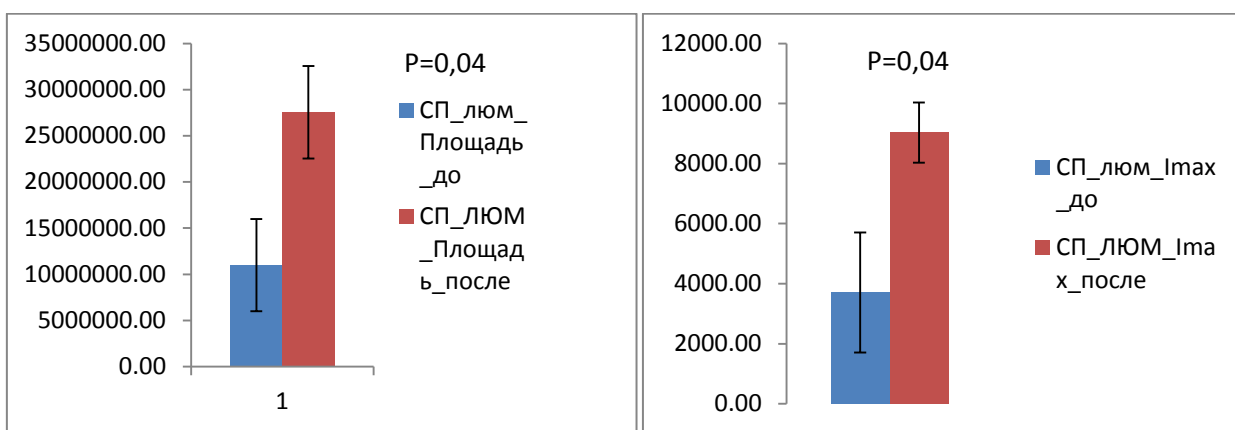


Рисунок 3 Изменение площади и интенсивности спонтанного люминол-зависимого хемилюминесцентного свечения до и после тренировочной нагрузки

Далее, мы провели исследование антиоксидантной активности в сыворотке крови и слюне у лошадей до и после нагрузки, и обнаружили, статистически значимое повышение интенсивности люминол-зависимого хемилюминесцентного свечения слюны и сыворотки крови до и после тренировочной нагрузки (рис.4). Полученные результаты характеризуют увеличенную активность антиоксидантной системы лошадей.

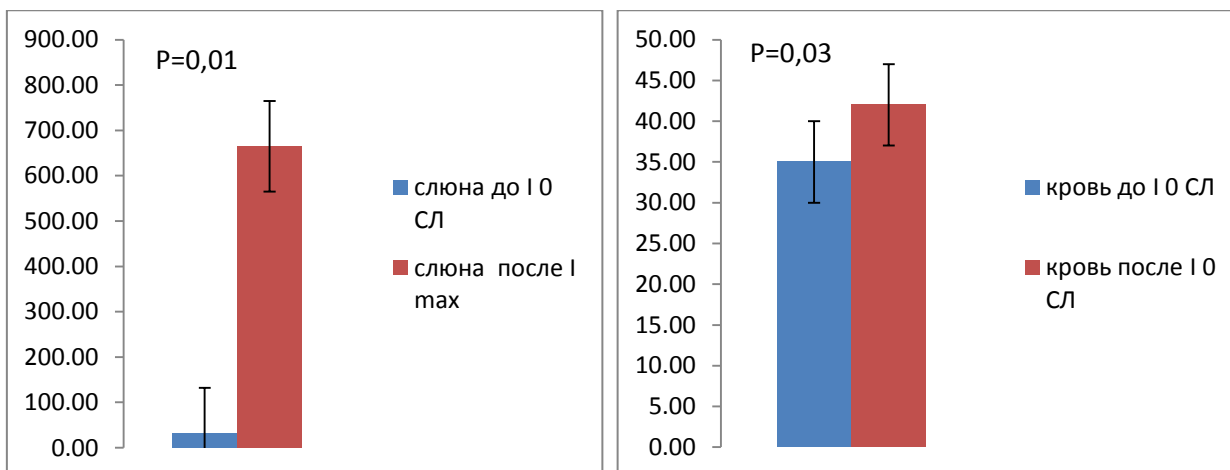


Рисунок 4 Изменение интенсивности люминол-зависимого хемилюминесцентного свечения слюны и сыворотки крови до и после тренировочной нагрузки

3.2 Результаты второго этапа средней тренировочной нагрузки

На втором этапе средней тренировочной нагрузки также происходит увеличение таких физиологических параметров как частота сердечных сокращений и количество дыхательных движений после нагрузки, что также является явными показателями испытываемой физической нагрузки (рис. 5).

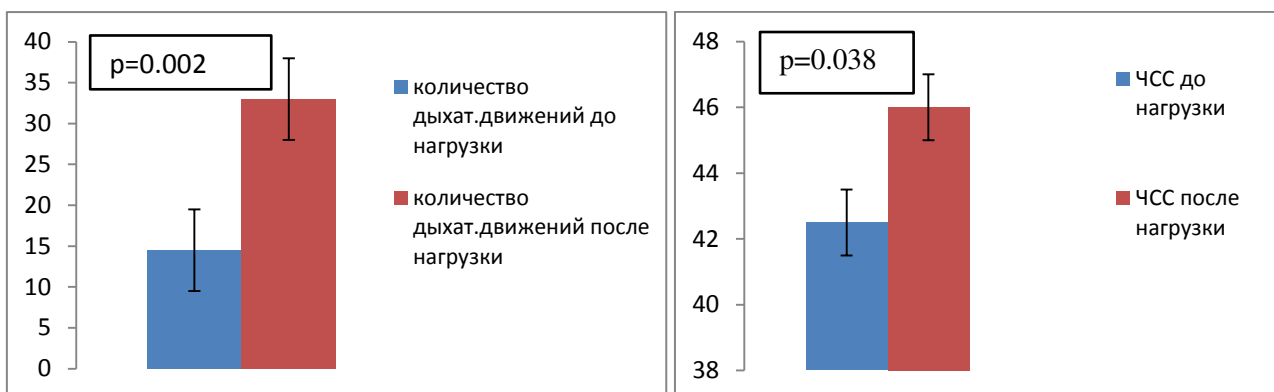


Рисунок 5 Изменение количества дыхательных движений до и после тренировочной нагрузки

Второй этап исследования интенсивности и площади спонтанного люцигенин-и люминол-зависимого хемилюминесцентного свечения после интенсивных физических упражнений также показал увеличение этих показателей (рис.6 и 7 соответственно). Что показывает накопление первичных

и вторичных радикалов кислорода в организме спортивных лошадей при увеличении интенсивности физической нагрузки.

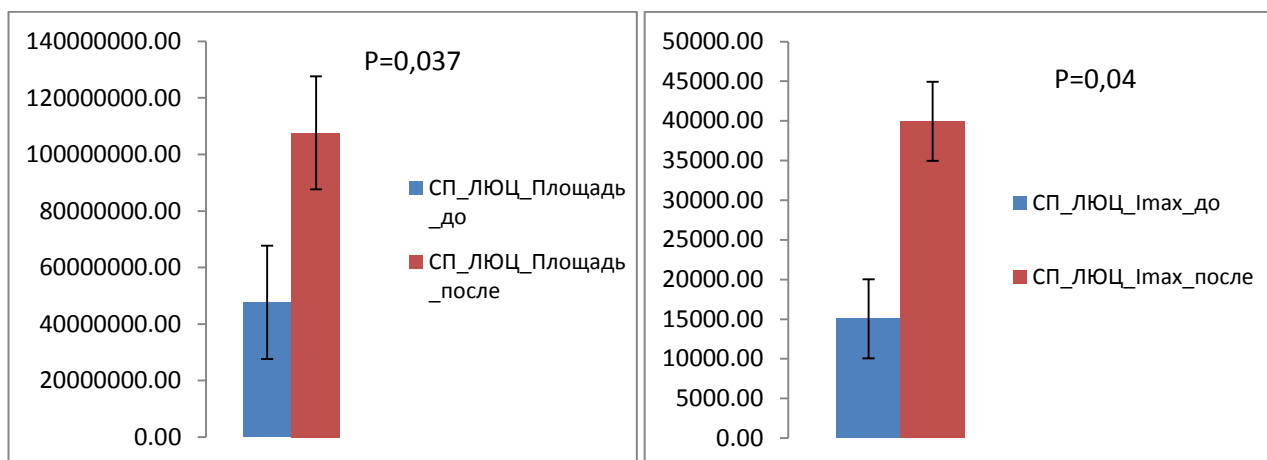


Рисунок 6 Изменение площади и интенсивности спонтанного люцигенин-зависимого хемилюминесцентного свечения до и после тренировочной нагрузки

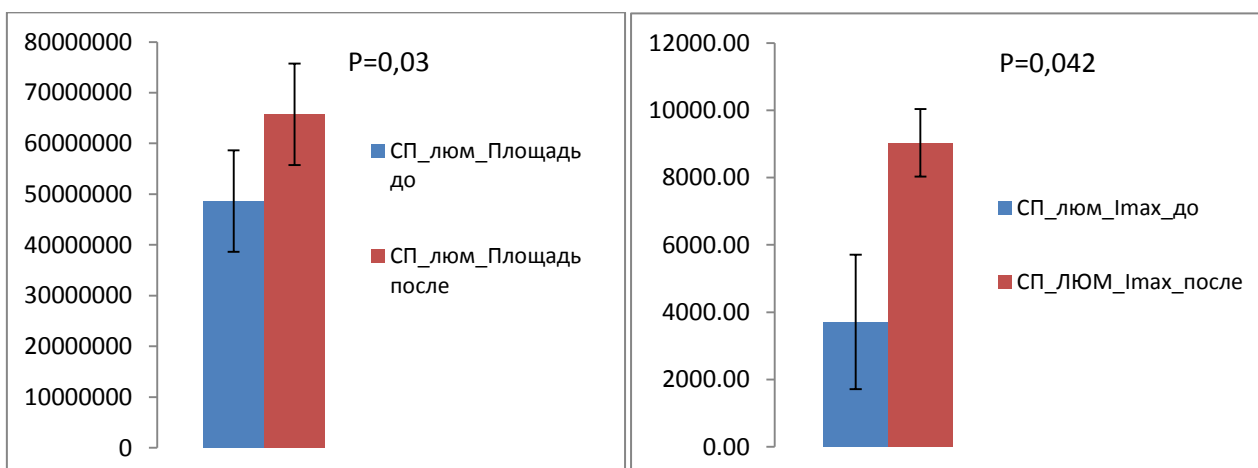


Рисунок 7 Изменение площади и интенсивности спонтанного люминол-зависимого хемилюминесцентного свечения до и после тренировочной нагрузки

Исследование антиоксидантной активности в сыворотке крови и слюне у лошадей до и после средней физической нагрузки, также показало статистически значимое повышение интенсивности люминол-зависимого хемилюминесцентного свечения слюны и сыворотки крови (рис.8). На втором этапе физической нагрузки активность антиоксидантной системы лошадей продолжала увеличиваться после упражнений.

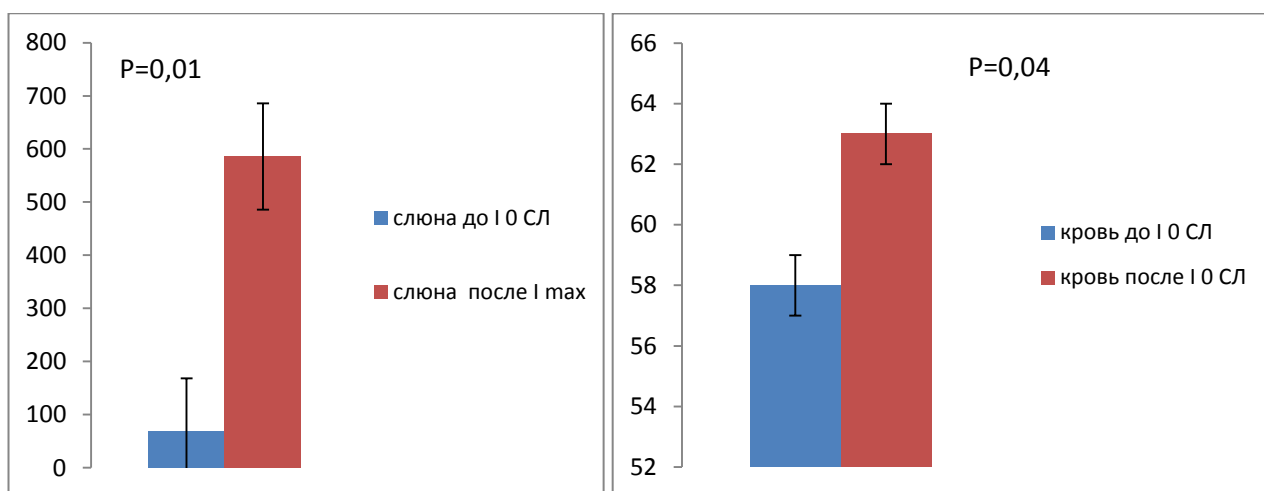


Рисунок 8 Изменение интенсивности люминол-зависимого хемилюминесцентного свечения слюны и сыворотки крови до и после тренировочной нагрузки

3.3 Результаты третьего этапа интенсивной соревновательно-тренировочной нагрузки

Результаты анализа третьего этапа интенсивной соревновательно-тренировочной нагрузки также показали, увеличение частоты сердечных сокращений и количества дыхательных движений после нагрузки (рис. 9).

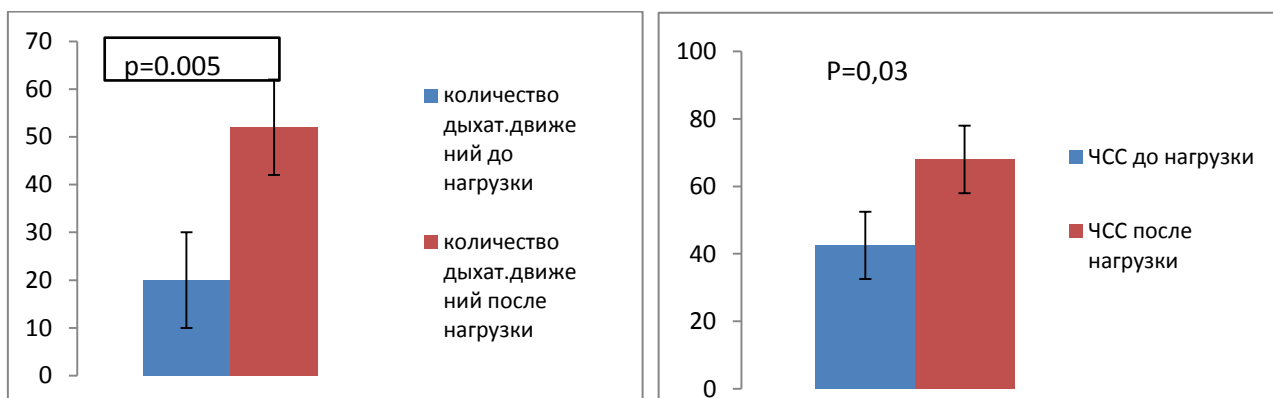


Рисунок 9 Изменение количества дыхательных движений до и после тренировочной нагрузки

Однако, исследование интенсивности и площади спонтанного люцигенин-и люминол-зависимого хемилюминесцентного свечения после интенсивных физических упражнений не показали достоверных результатов так как происходит адаптация организма спортивных лошадей к испытываемой

нагрузке, что подтверждается отсутствием достоверной зависимости между показателями оксидантной защиты организма.

Анализ антиоксидантной активности в сыворотке крови и слюне на третьем этапе нагрузки, также как и в предыдущих этапах показал статистически значимое повышение интенсивности люминол-зависимого хемилюминесцентного свечения слюны и сыворотки крови до и после тренировочной нагрузки (рис.10). Что свидетельствует о продолжении активной работы антиоксидантной системы.

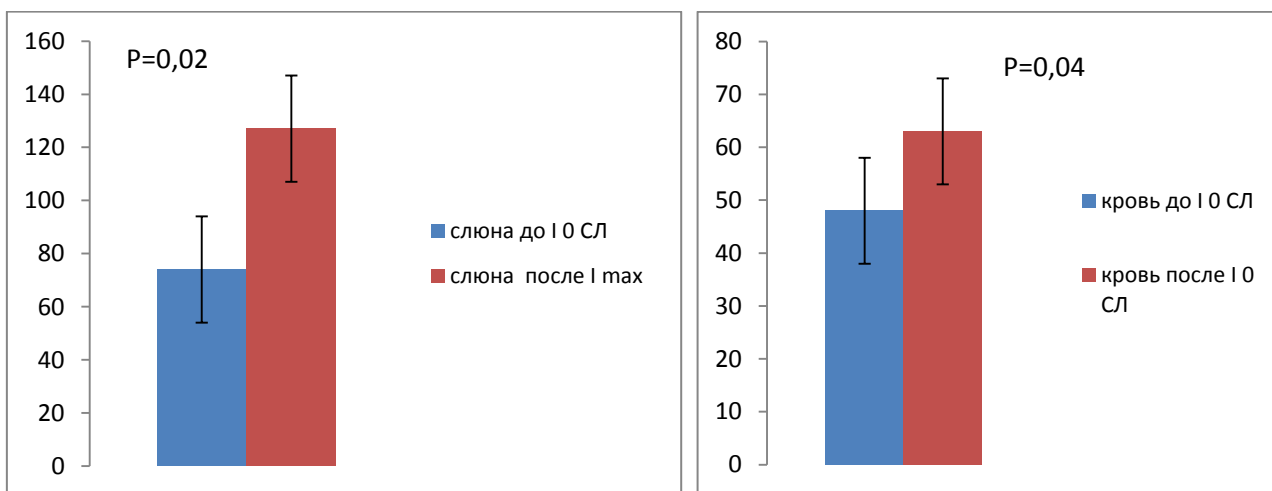


Рисунок 10 Изменение интенсивности люминол-зависимого хемилюминесцентного свечения слюны и сыворотки крови до и после тренировочной нагрузки

Проанализировав действие физической нагрузки на физиологическое состояние спортивных лошадей на трех этапах физической нагрузки, мы сделали выводы о том, что полученные результаты характеризуют повышенную активность оксидантной и антиоксидантной системы лошадей на двух этапах тренировочной деятельности, а также установили что на третьем этапе происходит адаптация организма спортивных лошадей к испытываемой нагрузке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Используемые биофизические методы дают возможность оценить физиологическое состояние животных и изучить адаптационные процессы к физическим нагрузкам различного объема и интенсивности. Изучение активности оксидантов и антиоксидантов у спортивных лошадей при интенсивных физических нагрузках в динамике показало, что данные методы могут быть использованы для оценки и корректировки тренировочных программ спортивных лошадей.

Дальнейшее исследование спортивных лошадей в динамике тренинга будет способствовать научному обоснованию оценки адекватности физических нагрузок и разработке эффективных коррекционных тренировочных программ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОЗ –антиоксидантная защита

НГ– нейтрофильные гранулоциты

СР – свободные радикалы

ХЛ – хемилюминесценция

ЧСС– частота сердечных сокращений

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Benbarek H., Ayad A., Deby-Dupont G., Boukraa L., Serteyn D. Modulatory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of equine neutrophils // *Vet Res Commun* - 2012. - № 36. - P. 29–33.
2. Cornelis M. B., Houterman W., Ploeg M. Monitoring training response in young Friesian dressage horses using two different standardised exercise tests (SETs) // de Bruijn et al. *BMC Veterinary Research* - 2017. - № 13. - P. 49.
3. Maged R., Sabry A., Mohamed E. Prognostic significance of lipid peroxide and antioxidant levels in draft horses with peritonitis // *Comp ClinPathol* - 2011. - № 20. - P. 433–439
4. Niedzwiedz A., Kubiak K., Nicpon J. Plasma total antioxidant status in horses after 8-hours of road transportation // Niedzwiedz et al. *ActaVeterinariaScandinavica* - 2013. - № 55. - P. 58.
5. Pablo G., Joao P. C., Fernando C. Biochemical profile of polo horses in training phase and those players of official competition // *Comp ClinPathol* - 2016. - № 25. - P. 911–915
6. Stacy L. A., Baljit S. Equine neutrophils and their role in ischemia reperfusion injury and lung inflammation // *Cell and Tissue Research* - 2018. - № 371. - P. 639–648.
7. Андрийчук А. В., Ткаченко Г. М., Ткачова И. В. Окислительный стресс у спортивных лошадей украинской верховой и голштинской пород в динамике физических нагрузок // *Научный журнал «Известия КГТУ»* - 2015. - №39.
8. Антонов, А. В. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита у троеборных лошадей в соревновательный период // *Сельскохозяйственная биология* - 2010. - № 6. - С. 47-49.

9. Грачева Т.А. Совершенствование хемилюминесцентного метода функциональной активности фагоцитирующих клеток // Клиническая лабораторная диагностика. - 2008. - №2. - С.54-55.
10. Камышников, В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – Москва: Медпрессин-форм, 2004.
11. Blazheevskly M. Ye., Chemiluminescence-based kinetic determination of drug/ М. Ye. Blazheevskly N. Yu. Bondarencо // Методы химического анализа – 2011. – Т. 6, №3. – С. 124-142.
12. Владимиров, Ю.А. Сверхслабые свечения при биохимических реакциях / Ю.А. Владимиров. – Москва: Наука – 1966. – С.126.
13. Владимиров, Ю.А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико биологических исследованиях / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – № 1. – С.16-23.
14. Швыдченко, И.Н. Цитосекретирующая функция нейтрофильных гранулоцитов / И.Н. Швыдченко, И.В. Нестерова, Е.Ю. Синельникова // Иммунология. – 2005. – №1. – С.31-34.
15. Елисеев В.Г. Гистология: под редакцией / В.Г. Елисеев, Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина. – Москва: Медицина. – 1983. – С.146.
16. Владимиров, Ю.А. Хемилюминесценция как метод обнаружения и исследования свободных радикалов в биологических системах / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина, Д.Ю. Измайлов // Бюллетень экспериментальной биологической медицины. – 2007. – Приложение № 2 (Сб. научных трудов, посвященных 25-летию создания НИИ физико-химической медицины). – 2007. – С. 13-20.
17. Нестерова И.В., Фомичева Е.В., Швыдченко И.Н., Петренко С.Г. Активация ядер нейтрофильных гранулоцитов в норме и у пациентов с острым деструктивным панкреатитом / И.В. Нестерова, Е.В. Фомичева,

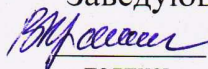
- И.Н. Швыдченко, С.Г. Петренко // Вестн. хирургич. гастроэнтерол. — 2007. — № 3. — С. 57.
18. Нестерова И.В., Швыдченко И.Н., Роменская В.А. и др. Нейтрофильные гранулоциты — ключевые клетки иммунной системы // Аллергология и иммунология. — 2008. — Т. 9, № 4. — С. 432-435.
19. Веселовский В.А. Хемилюминесцентный метод анализа в биологии // Спектроскопич. методы исследов. в физиол. и биохимии. — Л.:Наука. — 1987. — С. 34-37.
20. Угарова Н.Н., Боровко Л.Ю., Лебедева О.В. и др. Биолюминесцентные методы и реагенты для целей медицинской диагностики // Вестн. АМН СССР. — 1985. — № 7. — С.1540-1558.
21. Борисов А. Разработка хемилюминесцентного метода подбора иммуноактивных препаратов для персонифицированного лечения пациентов с инфекционно-воспалительными заболеваниями [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.startbase.ru/knowledge/articles/152/> (Дата обращения 04.03.2014)
22. Веселовский В.А. Хемилюминесцентный метод анализа в биологии // Спектроскопич. методы исследов. в физиол. и биохимии. — Л.:Наука. — 1987. — С. 34-37.
23. Бехало, В.А. Регуляция врожденного иммунного ответа в очаге хронического воспаления / В.А. Бехало, Е.В. Сысолятина, Е.В. Нагурская // Иммунология. — 2009. — №3. — С. 184-189.
24. Земсков, А.М. Проблема неспецифического и специфического в индукции и регуляции иммунологических реакций / А.М. Земсков, В.М. Земсков, М.А. Земсков // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2005. — №4. — С. 105-109.
25. Злакоманова, О.Н. Хемотаксис фагоцитов: значение в подборе индивидуальной дозы лекарственного препарата для коррекции локомоторных дисфункций фагоцитов у детей с травмой / О.Н.

- Злакоманова, А.В. Зурочка, А.В. Чукичев // Медицинская иммунология. – 2007. – Т.9, №4-5. – С. 479-492.
26. Винник, Ю.С. Динамика продукции активных форм кислорода лимфоцитами крови у больных острым панкреатитом / Ю.С. Винник, С.С. Дунаевская, Е.В. Портнягин, Г.В. Макарская// Сибирское медицинское обозрение. – 2010. – №1. – С. 35-38.
27. Marriott, H. M. Reactive oxygen species regulate neutrophil recruitment and survival in pneumococcal pneumonia / H. M. Marriott, L. E. Jackson, T. S. Wilkinson et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med.– 2008. – №8 – P.887-895.
28. Олиферук, Н.С. Оценка фагоцитарной и бактериальной активности нейтрофилов, макрофагов и незрелых дендритных клеток / Н.С. Олиферук //Иммунология. – 2005. – №1. – С.10
29. Benbarek H., Ayad A., Deby-Dupont G., Boukraa L., Serteyn D. Modulatory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of equine neutrophils // Vet Res Commun - 2012. - № 36. - P. 29–33.
30. Niedzwiedz A., Kubiak K., Nicpon J. Plasma total antioxidant status in horses after 8-hours of road transportation // Niedzwiedz et al. ActaVeterinariaScandinavica - 2013. - № 55. - P. 58.
31. Stacy L. A., Baljit S. Equine neutrophils and their role in ischemia reperfusion injury and lung inflammation // Cell and Tissue Research - 2018. - № 371. - P. 639–648.
32. Андрийчук А. В., Ткаченко Г. М., Ткачова И. В. Окислительный стресс у спортивных лошадей украинской верховой и голштинской пород в динамике физических нагрузок // Научный журнал «Известия КГТУ» - 2015. - №39.
33. Грачева Т.А. Совершенствование хемилюминесцентного метода функциональной активности фагоцитирующих клеток // Клиническая лабораторная диагностика. - 2008. - №2. - С.54-55.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой



В. А. Кратасюк

подпись


« 9 » 06 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

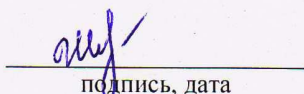
Активность про- и антиоксидантов у лошадей до и после физической
нагрузки

Научный
руководитель


подпись, дата

д.б.н., доцент О. А. Коленчукова

Выпускник


подпись, дата

И.С.Шевелева

Красноярск 2018