

**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение
высшего образования
«Кубанский государственный университет»**

На правах рукописи

Козин Станислав Владимирович

**ВЛИЯНИЕ ИЗОТОПНОГО D/H ОБМЕНА НА ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА
КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ**

Специальность 1.5. 2. - Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук,
профессор РАН
Барышев М.Г.

Краснодар 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	11
1.1 Влияние низких концентраций дейтерия на биологические объекты	11
1.2 Стресс и стресс – лимитирующая система организма.....	27
1.3 Патофизиологические механизмы повреждения головного мозга при гипоксических/ишемических состояниях.....	40
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТ И МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ.....	47
2.1 Содержание и кормление животных	47
2.2 Схемы экспериментов.....	47
2.2.1 ЯМР исследования сыворотки крови и масс – спектрометрические исследования тканей головного мозга крыс.....	47
2.2.2 Биохимические и поведенческие исследования.....	48
2.2.3 Электрофизиологические и культуральные исследования	50
2.3 Методика определения соотношения D/H в жидких средах и тканях организма.....	50
2.4 Биохимический анализ	52
2.4.1 Используемые реактивы	52
2.4.2 Приготовление супернатанта тканей головного мозга.....	54
2.4.3 Определение интенсивности хемилюминесценции.....	54
2.4.4 Определение уровня малонового диальдегида.....	54
2.4.5 Определение активности каталазы	55
2.4.6 Определение активности супероксиддисмутазы	56
2.4.7 Определение содержания восстановленного глутатиона.....	58
2.4.8 Определение активности глутатионпероксидазы	60
2.4.10 Метод Лоури.....	63
2.5 Поведенческие тесты	64
2.5.1 Приподнятый крестообразный лабиринт.....	64
2.5.2 Т-образный лабиринт.....	64
2.6 Электрофизиологические исследования.....	65
2.7 Исследование культуры нервной ткани.....	66
2.7.1 Культивирование клеток зерен – мозжечка.....	66
2.7.2 Методика экспериментов на культуре тканей.....	66
2.7.2.1 Внутриклеточное определение уровня активных форм кислорода, $[Ca^{2+}]$ и измерение мембранного потенциала митохондрий нейронов мозжечка.....	67
2.7.2.2 Определение уровня гибели нейронов при глюкозной депривации	67

2.7.2.3	Определение уровня гибели нейронов при температурном стрессе	68
2.8	Изучение активности пероксидазы хрена в модельных системах.....	68
2.8.1	Приготовление реактивов.....	69
2.8.2	Модельная система пероксидазы хрена - H ₂ O ₂ - дианизидин.....	69
2.8.3	Модельная система пероксидазы хрена - H ₂ O ₂ - люминол	70
2.9	Оптические исследования структуры пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина 71	
2.9.1	Приготовление реактивов.....	71
2.10	Способ получения обеднённой дейтерием воды.....	72
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....		73
3.1	Исследование изменения концентрации дейтерия в сыворотке крови и тканях мозга.....	73
3.2	Влияние изотопного обмена D/H на окислительные процессы в тканях головного мозга.....	75
3.3	Влияние изотопного замещения D/H в тканях головного мозга на тревожность крыс в приподнятом крестообразном лабиринте	80
3.4	Влияние изотопного обмена D/H в тканях мозга на выработку условно - рефлекторной реакции в «Т – лабиринте».....	82
3.5.1	Исследование влияния D/H – обмена на уровень АФК и Ca ²⁺ , величины МПМ нейронов мозжечка	84
3.5.2	Влияние изотопного обмена D/H на выживаемость нейронов мозжечка при глюкозной депривации и температурном стрессе.....	86
3.6	Изменение электрофизиологических показателей срезов гиппокампа	88
3.7	Влияние среды с низким содержанием дейтерия на активность пероксидазы хрена в модельных системах	93
3.7.1	Пероксидазное окисление о – дианизидина пероксидом водорода.....	93
3.7.2	Пероксидазное окисление люминола пероксидом водорода	96
3.8	Изучение структуры пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина в среде с пониженным содержанием дейтерия	97
3.8.1	Спектры триптофановой флуоресценции пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина.....	97
3.8.2	Спектры совместной триптофановой и тирозиновой флуоресценции пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина	98
3.8.3	КД – спектры пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина.....	99
ВЫВОДЫ		108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		110

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

^2H - дейтерий;

D/H - соотношение дейтерия к протию;

АОЗ - антиоксидантная защита;

АОС - антиоксидантная система;

АФК - активные формы кислорода;

БСА - бычий сывороточный альбумин;

ГАМК - гамма аминomásляная кислота;

ГД - глюкозная депривация;

ГП - глутатионпероксидаза;

ГР - глутатионредуктаза;

ГТ - глутатионтрансфераза;

ИСР - инкубационный солевой раствор;

МДА - малоновый диальдегид;

МПМ - мембранный потенциал митохондрий;

ОДВ - обедненная дейтерием вода;

ПКЛ - приподнятый крестообразный лабиринт;

ПОЛ - перекисное окисление липидов;

ПС - популяционный спайк;

ПХ - пероксидаза хрена;

СОД - супероксиддисмутаза;

СРО - свободно радикальное окисление;

ТБК - тиобарбитуровая кислота;

ЦНС - центральная нервная система;

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Гипоксия головного мозга является следствием нарушения мозгового кровообращения, сердечной и легочной недостаточности, черепно-мозговой травмы, объемных кровопотерь, снижения кислородной емкости крови и чрезмерных физических нагрузок [Воронина Т. А., 2016, Титов Б. В., 2015]. При этом аноксия мозга, вызванная цереброваскулярными нарушениями (инсульт), является наиболее опасной и занимает второе место после онкологических заболеваний по смертности и несет экономические потери за счет инвалидизации трудоспособных слоев населения [Sasaki N., 2019]. Это создает актуальность поиска новых эффективных способов повышения резистентности организма с целью профилактики гипоксических состояний и коррекции постгипоксических изменений в мозге.

Основными патологическими процессами при недостатке кислорода в тканях головного мозга являются дефицит макроэргических соединений, ацидоз, глутаматная и кальциевая эксайтоксичность, а также гиперпродукция АФК и азота [Ветровой О.В., 2017]. Эти явления способствуют развитию процессов перекисного окисления липидов, нарушению целостности цитоплазматической мембраны и мембраны органоидов клеток головного мозга, что приводит к апоптозу и некрозу нервной ткани [Fricker M., 2018]. Когнитивные функции связаны с интегративной работой разных отделов головного мозга. Когнитивная недостаточность может развиваться как при локальной, так и при объемной дисфункции клеток головного мозга. Поэтому одной из серьезных проблем постгипоксических состояний головного мозга является нарушение когнитивных способностей человека и развитие тревожных состояний [Kalaria Raj N., 2016].

Существует несколько способов коррекции постгипоксических состояний, применяемых в современной медицине. Один из них направлен на поддержание антиоксидантной системы организма [Воронина Т. А., 2016]. Другие направлены на сохранение кальциевого гомеостаза в нейронах и на

усиление синаптической пластичности нервных клеток, оказывая ноотропный эффект [Шустов Е. Б., 2016]. Как правило, для устранения последствий гипоксических состояний в головном мозге применяется комплексное медикаментозное лечение. При этом некоторые применяемые в клинической практике препараты не оказывают необходимого терапевтического действия и имеют побочные эффекты [Сергеев Д.В., 2011; Завалий Л.Б., 2018].

Актуальной задачей медицины и биологии является разработка новых эффективных и безопасных нейропротекторных средств, способствующих увеличению резистентности головного мозга к гипоксическим состояниям разной этиологии [Бурчинский С. Г., 2016].

Содержание дейтерия в природной воде составляет 150 ppm. Вода, в которой содержание дейтерия ниже природного значения – обедненная дейтерием вода (ОДВ). На сегодняшний день в научной литературе имеются данные о влиянии низких концентраций дейтерия на метаболические процессы в клетках и тканях млекопитающих. Уменьшение концентрации дейтерия в организме животных способствует усилению его антиоксидантных и антитоксических функций [Басов А. А., 2015; Rehasova R., 2016; Rasooli A., 2016; Джимак С. С., 2019]. Изменение баланса между дейтерием и протием во внутренней среде положительно влияет на стрессоустойчивость и уровень тревожности лабораторных животных при действии продолжительных стресс-факторов [Strekalova T., 2015], а также способствует улучшению референтной памяти [Mladin S., 2014]. Между тем остается открытым вопрос о механизмах реализации данных эффектов, вызванных направленным изотопным обменом D/H в жидких средах и тканях организма.

Таким образом, актуальной задачей представляется изучение влияния изотопного D/H обмена на физико-химические процессы в тканях головного мозга крыс в эксперименте при отсутствии и в условиях действия стрессовых реакций, а также анализ возможности применения, направленного изменения изотопного D/H состава в организме животных, для профилактики и коррекции постгипоксических состояний.

Цель и задачи исследования. Изучить антигипоксический эффект и механизм его реализации, вызванный искусственным изменением изотопного D/H состава в организме лабораторных животных. Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Оценить интенсивность окислительных процессов и антиоксидантного статуса в тканях головного мозга крыс в условиях нормоксии и моделирования острой гипоксии при предварительном потреблении воды с концентрацией дейтерия 50 ppm.
2. Исследовать влияние потребления лабораторными животными питьевого рациона с модифицированным изотопным D/H (50 ppm) составом на уровень тревожности и обучение крыс при нормоксии и в условиях острой гипоксии.
3. Изучить воздействие модификации изотопного D/H состава среды на выживаемость нейронов в норме и в условиях стресса в экспериментах *in vitro*.
4. Оценить содержание ионов кальция и продукцию активных форм кислорода в цитозоле нейронов при действии низких концентраций дейтерия.
5. Оценить мембранный потенциал митохондрий и электрическую активность нейронов в среде с низкой концентрацией дейтерия.
6. Изучить кинетико-термодинамические параметры ферментативной реакции в среде с модифицированным изотопным составом; оценить влияния среды с низкой концентрацией на структуру белков.

Научная новизна. Впервые показано, что снижение концентрации дейтерия в головном мозге оказывает антигипоксический эффект. Установлено, что продолжительное предварительное применение ОДВ в течение шести недель уменьшает развитие окислительного стресса и нормализует работу ферментов антиоксидантной защиты в тканях головного мозга после острой гипоксии. Выявлено, что уменьшение концентрации дейтерия в крови и тканях головного

мозга на фоне продолжительного применения ОДВ, уменьшает уровень тревожности в приподнятом крестообразном лабиринте и увеличивает время выполнения условно-рефлекторной реакции в Т-лабиринте у крыс, подвергшихся острой гипоксии.

Впервые получены экспериментальные данные о влиянии низких концентраций дейтерия на культуру нейронов мозжечка. Установлено, что инкубация культуры нейронов мозжечка в питательной среде с пониженным содержанием дейтерия, оказывает дополнительное цитотоксическое действие, увеличивая гибель нейронов при ГД и температурном стрессе. Также показано, что помещение нейронов мозжечка в среду с низкой концентрацией дейтерия приводит к уменьшению митохондриального потенциала, снижению ионов кальция и продукции активных форм кислорода в цитозоле нейронов мозжечка.

Впервые изучено действие низких концентраций среды на каталитические функции пероксидазы хрена в двух модельных системах.

Практическая значимость. Полученные данные о воздействии низких концентраций дейтерия на интенсивность окислительных процессов и антиоксидантный статус тканей головного мозга крыс, а также на когнитивные функции животных в условиях гипоксии при продолжительном приеме ОДВ свидетельствуют о возможном применении модификации изотопного состава среды организма для повышения его резистентности. Это дает основание использовать ОДВ в качестве профилактического средства в развитии нейродегенеративных процессов, сопровождающихся оксидативным стрессом и функциональными расстройствами центральной нервной системы. По результатам экспериментальной работы был получен патент «Способ профилактики и коррекции метаболических и функциональных нарушений центральной нервной системы в условиях стресса» (№271707). Вместе с тем, полученные результаты исследований *in vitro* могут быть использованы для понимания механизмов, объясняющих эффекты высоких и низких концентраций дейтерия в биологических объектах.

Апробация работы. Основные результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, представлены на IX Всероссийской конференции с международным участием «Спектроскопия координационных соединений» (Туапсе, 2012), XII научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (Севастополь, 2017), VI съезде биофизиков России (Сочи, 2019), на VI Международная конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Кольцово, 2019).

Публикации. Основные результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, изложены в 14 публикациях, 7 из которых входят в перечень журналов ВАК, которые также включены в систему Scopus и Web of Science.

Положения, выносимые на защиту:

1. Предварительное снижение концентрации дейтерия в крови и тканях головного мозга на фоне продолжительного потребления лабораторными животными питьевого рациона с модифицированным изотопным D/H составом оказывает антиоксидантный и антиамнестический эффект после перенесенной острой гипоксии, а также умеренно анксиолитический эффект в условиях нормоксии.

2. Снижение концентрации дейтерия в крови и тканях головного мозга на фоне непродолжительного потребления лабораторными животными питьевого рациона с модифицированным изотопным D/H составом оказывает прооксидантный эффект как в норме, так и на модели острой гипоксии.

3. Инкубация культуры нейронов мозжечка в среде с концентрацией дейтерия 50 ppm усиливает цитотоксическое действие глюкозной депривации и температурного стресса, приводит к снижению мембранного потенциала митохондрий, уменьшению уровня кальция и снижению продукции активных форм кислорода в цитозоле. Инкубация срезов гиппокампа в среде с концентрацией дейтерия 50 ppm приводит к уменьшению электрической активности нейронов гиппокампа.

4. Среда с концентрацией дейтерия 50 ppm приводит к снижению скорости пероксидазного окисления о-дианизидина и люминола в модельных системах пероксидазой хрена, не затрагивающая структурных изменений в активном центре фермента. Среда с концентрацией дейтерия 50 ppm не оказывает влияние на вторичную структуру пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина.

Структура и объем диссертации. Диссертация представлена на 133 страницах, состоит из введения, литературного обзора, методической части, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Иллюстративный материал включает 17 рисунков и 6 таблиц.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Влияние низких концентраций дейтерия на биологические объекты

Вода является самым распространенным веществом на земле, она играет ключевую роль в жизнедеятельности живых организмов. Вода входит в состав физиологических жидкостей организмов, выполняя функции растворителя и среды, в которой протекают различные биохимические превращения с участием ферментов.

Таблица 1. Некоторые изотопные стандарты природной воды

Изотопный стандарт		$\delta D, \text{‰}$	$\delta^{18}\text{O}, \text{‰}$	D, ppm	$^{18}\text{O}, \text{ppm}$
V-SMOW	Венский стандарт среднеокеанической воды	0	0	155,76	2005
SLAP	Стандарт легких антарктических осадков	-428	-55,5	89	1894
GISP	Осадки гренландского льда	-189,9	-24,85	126,2	955,37
NBS-1	Дистиллированная вода р. Потомак	-47,6	-7,9	148,35	1989,3
NBS-1A	Снег Йеллоустонского парка	-183,3	-24,33	127,2	1956,4

Молекула воды состоит из двух атомов водорода и одного атома кислорода. Водород и кислород существуют в природе в виде различных изотопов. Так атом водорода встречается в трех изотопных состояниях: протий ^1H – самый легкий (H), дейтерий ^2H (D) и самый тяжелый тритий ^3H (T).

Первые два являются стабильными, тогда как последний радиоактивный. Кислород существует в виде шести изотопов, из которых три являются стабильными: ^{16}O , ^{17}O и ^{18}O . Другие три изотопа ^{14}O , ^{15}O и ^{19}O являются радиоактивными. Исходя из такой разновидности изотопов водорода и кислорода, возможно существование 36 изотопных модификаций воды, из которых 9 являются стабильными. H_2^{16}O , H_2^{17}O , H_2^{18}O , HD^{16}O , HD^{17}O , HD^{18}O , D_2^{16}O , D_2^{17}O , D_2^{18}O [Игнатов И., 2003]. Содержание данных изотопных модификаций в природной воде не однозначно. Существуют изотопные стандарты для природной воды [Мосин О.В., 2012] (таблица 1).

Изучение влияния низких концентраций дейтерия на биологические объекты началось в 50-60-х годах прошлого века и активно продолжилось в 2000-х годах нынешнего столетия. Одним из эффектов снижения дейтерия в среде является способность к замедлению роста раковых клеток. Проведенные эксперименты по влиянию среды с пониженным содержанием дейтерия на динамику роста опухолевых клеток дали результаты на культуре тканей и на лабораторных животных. В работе [Feng-Song C. et al., 2010] установлено, что снижение концентрации дейтерия в культуральной среде до 25, 50 и 105 ppm, во всех случаях приводило к ингибированию карциномы легкого A549. При этом значительный эффект наблюдался после 10-ти и 72 -х часовой инкубации. Помещение раковых клеток линии A549 в среду, где содержание дейтерия составило 50 ppm, на 10 часов, 72 часа и на 40 суток вызывало изменение их морфологии. Авторами данной работы было установлено, что среда, обедненная дейтерием, вызывала апоптоз у 31 % раковых клеток данного вида через 48 часов и 25 % через 72 часа. В контрольной группе уровень клеток, подвергшихся апоптозу, был достоверно ниже и составил около 10%.

Похожие результаты были получены и другими авторами. Уменьшение концентрации дейтерия в культуральной среде до 90 ppm приводило к торможению процессов пролиферации раковых клеток носоглотки (CNE-1, CNE-2, 5-8F, 6-10B, Sune-1), а также процессов миграции, необходимых для образования метастазов [Wang H. et al., 2013]. Инкубация в среде с низким содержанием дейтерия способствовала ингибированию пролиферации раковых клеток предстательной железы человека PC-3, меланомы M-14 и молочной железы MCF-7 [Somlyai G. et al., 1997]. Также в литературе встречаются и противоположные результаты, когда снижение концентрации дейтерия в среде не оказало ингибирующего действия на рост раковых клеток *in vitro*. Такой же эффект был обнаружен в экспериментах с раковыми культурами, такими как MDA-MB 231, PC-3, AGS, U-87MG, HCT-11G, HDF-1, а также карциноме легкого HLF-1 [Feng-Song C. et al, 2010; Soleyman-Jahi S. et al., 2014.]. Однако совместное действие с паклитакселом, давало положительные результаты в отношении некоторых культур [Soleyman-Jahi S. et al 2014.]. При этом максимальный дозозависимый эффект от концентрации дейтерия был виден на культуре аденокарциномы человека MDA-MB 23, чем ниже была концентрация дейтерия в среде, тем сильнее проявлял себя препарат.

Исследователи из Каролинского института (Швеция) провели работу, в которой показали, что уменьшение концентрации дейтерия в среде инкубации приводило к изменению редокс потенциала раковых клеток [Zhang X. et al., 2019]. Также ими было изучено влияние среды с измененным изотопным составом D/H на пролиферацию клеток следующих культур: аденокарциномы молочной железы человека MCF7, рака легкого человека A549 и клеток колоректальной аденокарциномы человека HT29. Культуры выращивали в среде, приготовленной на ОДВ, с концентрацией дейтерия 60, 80, 100, 120 и 150 ppm в течение 48 часов. Клетки линии MCF7 слабо реагировали на снижение концентрации дейтерия в питательной среде, в то время культура HT29 продемонстрировала снижение пролиферации примерно на 20 % при концентрации дейтерия 100 ppm. Раковые клетки A549 оказались наиболее

чувствительными к концентрации дейтерия, при этом наибольшее ингибирование пролиферации этих культур происходило при 80 ppm. Авторы данной статьи, используя метод функциональной идентификации мишени с помощью экспрессионной протеомики – FITEXP [Chernobrovkin A. et al., 2015] также установили, что ОДВ вызывает экспрессию генов, приводящих к активации ряда сигнальных белков. Например, было показано, что понижение концентрации дейтерия во внутриклеточном пространстве приводит к активации убиквитин-связывающего белка p62, участвующего в процессах аутофагии [Cha-Molstad H. et al., 2017], кинезин - подобного белка KIF23, играющего важную роль в цитокинезе [Sun et al., 2015], а также аденодоксин-НАДФ-редуктазу, которая участвует в переносе электронов в митохондриальной системе. Все это вызывает дисбаланс между продукцией и нейтрализацией АФК в митохондриях. Таким образом, уменьшение концентрации дейтерия в среде индуцирует окислительный стресс в раковых клетках, вызывающий апоптоз. Понижение содержания дейтерия в инкубационной среде, как и противораковый препарат 5-фторурацил, приводило к ингибированию роста раковых клеток молочной железы человека MCF - 7 [Yavari K., 2019]. Одинаковый эффект был достигнут при 24-х часовой инкубации при содержании дейтерия от 100 до 30 ppm. Инкубация в течение 48-ми часов не оказала влияния на рост раковых клеток. Наибольшая цитотоксичность наблюдалась при 72-х часовой инкубации в среде с концентрацией дейтерия 50 и 30 ppm. Уменьшение содержания дейтерия в среде, как и действие препарата вызывало изменение клеточного цикла в период интерфазы, что приводило к снижению количества клеток, находящихся в S и G₂ фазах. Клетки во фракции S-фазы снизились на 2,25% при 30 ppm, при концентрации дейтерия 75 ppm на 1,82% и на 0,25% при 100 ppm по сравнению с контрольной группой (150ppm), при этом эффект не был обнаружен при 125 ppm и 50 ppm. В фазе G₂ уменьшение популяции клеток в средах, где концентрация дейтерия была 30, 50, 75, 100 и 125 ppm, составило соответственно 1,36; 6,54; 2,26; 4,48 и 5,87 % по сравнению с клетками,

культивированными в среде, приготовленной на воде с природным содержанием дейтерия.

Введение в рацион животных ОДВ, приводит к созданию изотопного градиента D/H между потребляемой водой и жидкой средой организма, а также между внутренними жидкостями и тканями. В результате чего происходит понижение концентрации дейтерия в жидких средах и тканях организма [Diane M. O'Brien, 2007; Джимак С.С. и др, 2014]. Авторы работы [Джимак С.С. и др, 2014] с помощью масс и ЯМР-спектрометрии установили, что после 40 дневного рациона ОДВ, концентрация дейтерия в наибольшей степени уменьшалась в плазме крови и почках и составила 100 и 110 ppm. В лиофилизированных тканях печени и сердца концентрация дейтерия составила 125 ppm. Также была исследована динамика изменения концентрации дейтерия в следующих 4-х поколениях крыс возрастом четыре месяца, которые на протяжении жизни также получали ОДВ. Эксперимент показал, что концентрация дейтерия в плазме крови, сердце, печени и почках также снижалась и не отличалась от первого поколения.

В литературе имеются сведения о влиянии низких концентраций дейтерия на рост прививаемой животным опухоли. Так сотрудники НИИ "Онкологии им. Блохина" совместно с НИИ "Медико-биологических проблем" установили, что введение в рацион мышей ОДВ способствовало защитному эффекту в отношении прививаемых клеток карциномы легких Льюиса (LLC) и рака шейки матки [Турусов В. С. и др., 2006]. Оказалось, что у мышей, предварительно получавших ОДВ в течение 40 дней, время появления первых опухолевых узелков и время продолжительности жизни было больше, чем у контрольной группы. У опытных мышей с раком шейки продолжительность жизни была достоверно выше и составила 50 суток в отличие от контроля, где продолжительность составила 40 суток. У опытных животных с карциномой Льюиса также была отмечена тенденция увеличения продолжительности жизни 44 суток против 39. Схожие результаты были получены этими исследователями

и в отношении саркомы матки Cm232 [Турусов В. С. И др., 2004], а также другими учеными на различных прививаемых культурах.

Группой румынских исследователей были получены положительные результаты в нескольких опытах с прививанием животным раковых клеток. ОДВ (90 ppm) вводилась в рацион опытной группы на поздних стадиях развития опухоли [Somlyai G. et al., 1998]. В результате в экспериментальной группе у 4-х мышей наблюдалось полная регрессия опухоли, в семи случаях частичная регрессия, у восьми особей опухоль прогрессировала. В контрольной группе у всех животных наблюдалось разрастание раковых клеток. В следующем эксперименте за день до пересадки мышам аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 и MCF-7 опытной группе в рацион вводили ОДВ (30 ppm), что приводило к увеличению продолжительности жизни животных [Somlyai G. et al., 1993]. Успешными получились результаты экспериментов, сделанные на собаках. Рацион с пониженным содержанием дейтерия течение 3-х недель приводил к регрессу опухоли молочной железы на 60-70%. Полное исчезновение опухоли было зафиксировано у одного животного через 8 месяцев применения ОДВ [Somlyai G. et al., 1998]. Известно, что нарушение экспрессии белков, контролирующих процессы апоптоза, пролиферации, ангиогенеза, транскрипцию ДНК может привести к злокачественным образованиям. К таким белкам относят Kras, p-53, CDKN-2A, BRCA2, Bcl-2, Muc и т.д. [Almoguera C. et al., 1988; Lohr M. et al., 2005; Schutte M. et al., 1997; Pantalone D. et al., 2004; Пасевич Д. М. и др., 2016]. Введенный лабораторным мышам канцероген диметилбензантрацэна усиливал экспрессию протоонкогенов через 24 часа. Рацион со сниженным содержанием дейтерия (20 ppm) в течение недели до введения диметилбензантрацэна, приводил к снижению выработки сигнальных белков Bcl2, Kras и Muc на фоне данного канцерогена [Gyöngyi Z. et al., 2013].

В Венгрии на основании положительных лабораторных данных вводятся клинические исследования ОДВ как средства, способствующего усилению действия химиопрепаратов и ионизирующего излучения в борьбе с раковыми

заболеваниями. Противоопухолевые результаты в ходе клинических исследований были получены на людях добровольцах, страдающих раком предстательной и молочной железы, а также раком легких разной степени тяжести. В ходе этих испытаний установлено, что дополнительное включение ОДВ в существующие схемы лечения (химиотерапия, лучевая терапия) на любой стадии развития опухоли, замедляет дальнейшее ее прогрессирование, увеличивает среднюю продолжительность жизни, в том числе у метастазированных пациентов [Kovacs A. et al., 2011; Krempels K. et al., 2008, 2013]. Так, в работе [Kovacs A. et al., 2011] было исследовано влияние ОДВ на продолжительность жизни четырех пациентов с раком легких и метастазами в головном мозге совместно с традиционной терапией. У первого пациента наблюдалась 2-стадия с множественными метастазами в головном мозге. Время лечения ОВД составило 17,5 месяцев, а продолжительность жизни после лечения составила 9,1 месяцев. У второго пациента, имеющего 2 стадию рака с единичными метастазами, продолжительность лечения составила 3 месяца, а продолжительность жизни после лечения 10,2 месяца. У следующего пациента ОДВ в рационе была 9,7 месяцев с последующей смертью при 4 стадии рака и четырьмя метастазами в мозг. Среднее прогнозируемое время жизни 3 недели. Последний пациент – доброволец (1 стадия рака и 2 метастазы) применял в рацион ОДВ в течение 31,7 месяцев и прожил после лечения 1,7 месяцев.

Поиск новых средств, обладающих радиопротекторными свойствами в условиях длительных космических полетах, способствовал ряду экспериментов по изучению защитных эффектов ОДВ при действии радиации на организм. В работе [Иванов А. А. и др., 2013] было установлено, что 30-ти дневное применение ОДВ с концентрацией дейтерия равной 35 и 90 ppm сразу после облучения ослабляло течение и последствия лучевой болезни. Увеличивалась выживаемость лабораторных животных (до 40-55 %) в рационе которых была ОДВ на фоне длительного воздействия γ - излучением в дозе 6, 5 Гр, по сравнению с животными, которые употребляли воду с концентрацией дейтерия

150 ppm (выживаемость составила 10 и 16,6 %). Острая лучевая болезнь на 3 - 10 сутки эксперимента приводила к значительному снижению массы облученных животных. Тем не менее, в группе «излучение - ОДВ» масса тела животных на протяжении всего эксперимента была выше, чем у животных группы «излучение». Применение ОДВ на фоне воздействия излучения (8 суток) способствовала более интенсивному гемопоэзу, чем у облученных контрольных животных. Это выражалось достоверным увеличением ядросодержащих клеток в костном мозге, эндогенных колониеобразующих единиц в селезенке и лейкоцитов в периферической крови. Авторы следующей работы [Куликова Е. И., др., 2012] не обнаружили защитных действий ОДВ. Так, у животных, которые 8 суток получали ОДВ (35 ppm), динамика смертности и масса тела после однократного облучения (8,5 Гр) животных была на уровне контроля. Не было различий и по показателям клеточности костного мозга. В следующей модели эксперимента животные подвергались воздействию γ - излучения в дозе 7,6 Гр на 19 и 21 сутки после применения ОДВ. В данном опыте летальный исход был ниже у контрольных животных ($8,2 \pm 0,2$) против опытной группы «Излучение-ОДВ» ($9,7 \pm 0,4$). Содержание животных на ОДВ в течение 21 дня после однократного воздействия излучения в дозе 4 Гр приводило к достоверному снижению пролиферативной активности костного мозга, кроме того масса селезенки была в два раза выше, чем у животных в группе «излучение - контроль». Следует отметить, что в описанном выше эксперименте исследователи использовали не минерализованную ОДВ, что могло повлиять на качество эксперимента. Известно, что хрусталик глаза очень чувствителен к воздействию радиации и его можно использовать как индикатор радиопоражения [Fish D. et al, 2011]. Авторы следующего эксперимента [Абросимова А. Н. и др., 2009] применяли ОДВ в течение 2 - х месяцев до воздействия облучения (0,25, 0,5 и 1 Гр ежедневно по 15 минут в течение 80 дней) и на протяжении всего эксперимента. У мышей, облученных дозой 0,25 Гр частота помутнений хрусталика была на уровне контрольных значений. Излучение с дозой 0,5 и 1 Гр вызывало помутнение хрусталика у

контрольных животных уже на 18 день эксперимента. У грызунов, в рационе которых была ОДВ, первые признаки помутнения появились только на 46 сутки воздействия γ - излучением. Далее на протяжении всего опыта частота возникновения помутнений была в 1, 5 раза ниже у мышей в группе “излучение - ОДВ”. Созревание катаракты у этих животных происходило на много медленнее, чем у контрольных облученных животных. Митотический индекс является важным показателем жизнеспособности клетки, так ингибирование митотической активности на 50% приводит к гибели клеток [Panda V.V. et al, 1985]. А его снижение после радиационного воздействия малых и больших доз является общепринятым фактом [Южаков В. В. и др., 2013], а увеличение процента абберентных митозов костного мозга является показателем радиотоксичности [Хвостунов И. К. и др., 2013]. Такой же эффект наблюдается и при перенесенном психоэмоциональном стрессе в результате которого увеличивается количество хромосомных aberrаций в клетках головного мозга [Дюжикова Н.А. и др., 2015, 2018]. Предварительное введение (14 дней) в рацион мышей ОДВ (35 ppm) перед радиационным воздействием приводило к увеличению процента делящихся клеток, уменьшению продолжительности первого клеточного цикла и увеличению хромосомных aberrаций, в отличие от групп, в рационе которых была вода с природным содержанием дейтерия [Ворожцова С. В. и др., 2014]. Длительный рацион ОДВ (35 ppm) оказывал неравномерный характер изменения клеточного состава селезенки мышей через 7,15 и 30 суток после однократного облучения дозой 0,5 Гр [Григоренко Д. Е., 2015]. Действие ОДВ на 7-е сутки после облучения приводит к уменьшению интенсивности лимфоцитопоза. Данный эффект выражался снижением количества бластов, митотически делящихся клеток и увеличением деструктивно измененных клеток в лимфоидных узелках и периартериальных лимфоидных муфтах. Спустя 15 суток после облучения мышей показатели содержания бластов одинаковы в контрольной группе животных, и в группе, в рационе которых была ОДВ. При этом число клеток с картинами митозов в периартериальных лимфоидных муфтах в 1,8 раза больше при употреблении

ОДВ, чем воды с концентрацией дейтерия 150 ppm. Следует отметить, что на 15-е сутки после облучения в обеих зонах органа животных группы “облучение - ОДВ” содержание малых лимфоцитов превышает контрольные показатели в 2,0 и 1,2 раза. В данный период эксперимента в результате действия ОДВ в центрах размножения лимфоидных узелков отмечается более высокое число разрушающихся клеток, тогда как в другом участке селезенки таких закономерностей выявлено не было. На 30 сутки эксперимента в центрах размножения лимфоидных узелков после употребления ОДВ содержание молодых форм клеток меньше, чем при употреблении воды с естественным содержанием дейтерия. Показатели деструкции снижаются к концу эксперимента в обеих опытных группах. Однако в лимфоидных узелках селезенки мышей, которые употребляли обычную воду, количество деструктивных клеток практически не изменялось в течение эксперимента. В этой же области число деструктивных клеток к концу опыта уменьшилось примерно в два раза у животных, употреблявших ОДВ. Таким образом, результаты данного исследования показали, что введение в рацион животных ОДВ приводит к усилению лимфоцитопоза в пострadiaционный период.

В ряде экспериментов *in vitro* установлено, что обедненная дейтерием питательная среда оказывала влияние на рост не патологических клеточных культур. Так в работе [Zlatska A. et al, 2018] показано, что среда с различной концентрацией дейтерия влияет на жизнеспособность и морфологию стволовых клеток жирового происхождения. Так в среде с повышенным содержанием дейтерия (10000 – 500000 ppm) клетки имели ярко выраженное изменение морфологии, характеризующееся снижением ядерно-цитоплазматического отношения, повышенной перинуклеарной зернистостью и наличием стрессовых волокон. Более того, плотность клеток была значительно меньше по сравнению с контрольной группой, а делящиеся клетки практически отсутствовали. Среда с концентрацией дейтерия 75 ppm практически не оказала морфологических изменений данных клеток. Отмечено, что максимальная жизнеспособность клеток данной культуры наблюдалась в среде с естественным содержанием

дейтерия и в среде с концентрацией 75 ppm. Понижение дейтерия до 15 ppm уменьшало выживаемость клеточных культур после 24-х и 72-х часов инкубации на 6 и 7 %. Наибольший угнетающий эффект наблюдался при концентрациях дейтерия 500000 ppm. При этом жизнеспособность клеток была снижена на 48 % при суточном и на 23 % при 72 – х часовом воздействии. Снижение концентрации дейтерия ингибировало рост линий клеток фибробластов LQ19, а незначительное повышение дейтерия в питательной среде увеличивало их пролиферативную активность [Somlyai G. et al, 1993]. Увеличение пролиферации эндотелиальных клеток происходило как при понижении, так и при повышении дейтерия в среде [Андреева Е. А. и др., 2005].

В некоторых исследованиях, в том числе в работах нашей лаборатории, были установлены антиоксидантные и антитоксические эффекты, вызванные на фоне длительного применения ОДВ. Румынскими исследователями были получены данные, свидетельствующие о защитном действии ОДВ (30 ppm) при токсическом поражении органов тяжелыми металлами [Olariu Lucia et al, 2007,2008,2010]. В этих работах было показано, что длительное употребление ОДВ (в течение 60 дней) на фоне интоксикации Cd^{2+} приводило к снижению уровня свободных радикалов и к менее выраженной дисфункции работы основных ферментов АОЗ плазмы крови, тканей печени и почек по сравнению с животными, у которых на фоне интоксикации был питьевой рацион на воде с природным содержанием дейтерия. У животных, рацион которых составляла вода с естественным содержанием дейтерия, была отмечена более высокая нагрузка печеночных ферментов АЛТ и АСТ при интоксикации кадмием, и ее достоверное снижение в крови животных, получавших ОДВ. Введение в рацион животных ОДВ приводило к менее интенсивному накоплению токсичных металлов (кадмий и хром) в печени и почках.

Проведенные исследования в нашей лаборатории показали, что изотопный обмен в тканях животных на фоне продолжительного применения ОДВ (40 ppm) в течение 42 суток способствовал повышению резистентности организма крыс при хроническом эндотоксикозе, вызванном тетрахлорметаном

[Джимак С. С. др., 2015]. Интоксикация тетрахлорметаном приводила к снижению антиоксидантной активности крови животных, а также увеличению активности АЛТ, АСТ и щелочной фосфатазы, повышению концентрации холестерина, креатинина и триглицеридов в плазме крови, что свидетельствовало о токсическом повреждении печени на фоне токсической нефропатии. Крысы, которые после хронического эндотоксикоза получали ОДВ на протяжении 42 дней (протекторное действие), а также крысы, в рационе которых ОДВ была за 14 дней до и 42 дня после интоксикации (профилактическое и корригирующее действие) имели более низкий интегральный показатель хронической интоксикации.

Введение грызунам диеты, богатой фруктозой, вызывало в организме метаболический синдром, который индуцировал липогенез печени и гипергликемию. Это сопровождалось увеличением содержания триглицеридов, холестерина и глюкозы в крови [Mamikutty N., et al, 2014; Решетняк М.В. и др., 2011; Gajda A.M., et al, 2007]. Кормление крыс фруктозой оказывало влияние на работу сердечно – сосудистой системы. Происходило повышение систолического кровяного давления и увеличение массы левого желудочка, также наблюдалось расширение желудочков сердца, снижение их сократительной функции и гипертрофия [Chang K.C., et al, 2007; Andrews P., et al, 1992; Лещенко Д.В. и др., 2015]. В работе [Rehacova R., et al, 2016] авторы изучали действие совместного рациона фруктозы и ОДВ (55 ppm) на крыс двух линий Wistar-Kyoto (WKY) и Wistar-Kyoto – SHR (крысы с высоким кровяным давлением). Ни ОДВ, ни фруктоза не оказали существенного влияния на артериальное давление у обеих линий крыс. Вызванное изотопное D/H замещение у крыс линии WKY снизила уровни общего холестерина и триглицеридов, но не смогло предотвратить увеличение тех же самых параметров, повышенных из-за обработки фруктозой как в одной, так и в другой линии крыс. И фруктоза, и ОДВ по отдельности каждая повышали уровень инсулина в линии WKY, тогда как в линии SHR наоборот понижали. При этом у крыс, подвергшихся изотопному обмену, имели показатели близкие

к контролю. Уровень глюкозы в крови был высокий во всех линиях крыс, потреблявших только фруктозу. Изотопный обмен D/H в тканях и крови животных на фоне потребления фруктозы снизил показатели глюкозы в плазме крови. Фруктоза не влияла на активность NO - синтазы ни в WKY, ни в SHR. Низкодейтериевый питьевой рацион способствовал увеличению активности NO – синтазы в левом желудочке как у крыс линии WKY, так и у SHR. Снижение концентрации дейтерия в организме экспериментальных животных уменьшала активность NO – синтазы и экспрессию генов индуцированной NO - синтазы в аорте SHR как с обработкой фруктозой, так и без нее, облегчая, таким образом, последствия метаболического синдрома, вызванного фруктозой.

Иранские исследователи экспериментально продемонстрировали, что изотопный обмен D/H в тканях вызывает гепатопротекторный эффект на разных моделях повреждения печени. Так в одной из работ [Rasooli A., et al, 2016] применение ОДВ (30 и 60 ppm) в течение двух недель оказало усиление резистентных функций организма крыс на фоне интоксикации, вызванной ацетоминофеном (парацетамол). Данный препарат вызывал серьезное повреждение печени, что было отмечено значительным снижением активности сывороточной ГП, ГР и СОД, а также содержанием GSH. Кроме того, это привело к значительному повышению уровней свободного железа в крови и увеличению интенсивности ПОЛ, а также активности АСТ. Экспериментальные данные этой работы указывают на гепатопротекторную активность ОДВ в отношении токсичности, индуцированной ацетоминофеном, при значительном снижении интенсивности уровня ПОЛ и АСТ с последующим повышением уровней GSH и антиоксидантных ферментов (СОД, ГП и ГР). В следующей работе этими же авторами был показан антиоксидантный и противовоспалительный эффект применения ОДВ (15 и 30 ppm) на модели сепсиса у грызунов [Rasooli A., et al, 2019]. Было продемонстрировано, что введение в рацион крыс воды с пониженным содержанием дейтерия, на фоне лапаротомии способствовало уменьшению уровня простагландина E₂ в плазме крови и снижению экспрессии

генов циклооксигеназы в ткани печени по сравнению с животными, у которых также моделировали сепсис путем разрезания брюшной полости, но в рационе была вода с концентрацией дейтерия 150 ppm. Развитие сепсиса приводило к активации активных форм кислорода и ПОЛ (повышение концентрации продуктов ПОЛ способных реагировать с ТБК), подавлению низкомолекулярного АОЗ, что выражалось уменьшением концентрации GSH и уменьшением активности глутатион – S – трансферазы, а также повышению активности миелопероксидазы, АСТ, АЛТ и щавелевой фосфатазы в тканях печени. Однако данные показатели были достоверно ниже в группе животных, которых лечили ОДВ, что отражает более низкий уровень поражения печени. Также в пользу этого говорят данные гистологических исследований данной работы. Такие показатели как маргинализация и инфильтрация нейтрофилов, зернистая дегенерация, воспалительные очаги и инфильтрация мононуклеарных клеток и гиперплазия клеток Купфера были более приближены к показателям тканей печени контрольных животных у крыс, которые потребляли ОДВ. Применение ОДВ на фоне сепсиса оказало антиоксидантный, противовоспалительный и гепатопротекторный эффект, однако, разные концентрации дейтерия 15 ppm и 30 ppm оказали практически одинаковый терапевтический эффект.

В двух выше изложенных работах установлен синергетический эффект питьевого рациона с пониженным содержанием дейтерия. Так на основании работы [Rasooli A., et al, 2019] и на основании проведенных экспериментов в отношении антисептического действия эфирного масла *mentha longifolia* l., иранские исследователи утверждают об усилении противовоспалительного и антиоксидантного эффекта данного эфирного масла при совместном применении с ОДВ. Также эти авторы указывают на более выраженные гепатопротекторные свойства эфирных масел *Satureja rechingeri* при совместном применении с ОДВ. Следует отметить, что авторами этих двух статей не было проведенного статистического анализа между группами ОДВ + эфирные масла + сепсис и группой эфирные масла + сепсис. В работе

[Барышева Е.В., 2015] автором были предоставлены данные о лечебном эффекте потребления ОДВ при моделировании у крыс аллоксанового диабета. Введение аллоксана в дозе 17 мг/100 г приводило к усилению свободнорадиальных процессов в плазме крови, а также в тканях сердца, почек и печени, что отражалось в увеличении интенсивности хемилюминесценции и числа продуктов, реагирующих с ТБК. Наблюдалось снижение активности низкомолекулярного звена АОЗ. В плазме крови возрастала концентрация глюкозы, билирубина, креатинина, мочевины и увеличивалась активность АЛТ, АСТ. Все эти метаболические изменения, вызванные аллоксаном, были ниже в группе животных, у которых концентрация дейтерия в тканях была снижена.

В литературных источниках существуют работы, в которых рассматривается влияние низких концентраций дейтерия на ЦНС. Снижение дейтерия в организме, также, как и антидепрессант циталопрам уменьшает ангедонию у мышей, вызванную в течение 10 дней периодически меняющимися стресс-факторами: социальное воздействие, стресс-хищника, подвешивание за хвост [Strekalova T., et al,2015]. Группа стрессорных животных, в рационе которых была ОДВ, не изменяли предпочтения к сахарозе, в отличие животных у которых был рацион с естественным содержанием дейтерия. Следует отметить, что облегченная по дейтерию вода в контрольной группе животных не давала достоверной разности в предпочтении к сахарозе. Стрессированные мыши, подвергшиеся влиянию изотопного D/H обмена, имели более высокие показания массы и состояния качества шерсти после 10 дневного протокола стресса, в отличие от мышей, которые были на обычном рационе. Стресс вызывал замедление нейрогенеза в зубчатой фракции гиппокампа и изменение работы серотонинового транспортера [Pham K.,2003; Бохан Н. А., 2013]. У стрессированных животных, в рационе которых была ОДВ, наблюдалось большее количество brdu-положительных клеток, что свидетельствовало о более интенсивном процессе пролиферации в гиппокампе этих животных, а также уменьшение экспрессии генов, ответственных за синтез SERT.

Исследования румынских ученых [Mladin C. et al, 2014] показали, что длительное применение ОДВ способствовало сохранению навыков обучения в Y-образном и радиальном восьми лучевом лабиринте. Было установлено, что снижение содержания дейтерия не значительно уменьшало количество ошибок рабочей памяти в обоих лабиринтах и достоверно уменьшало количество ошибок референтной памяти в радиальном лабиринте. Также в группе опытных животных наблюдается тенденция к уменьшению времени, необходимого для решения задачи. Вызванный изотопный обмен в организме крыс на фоне однодневного применения легкоизотопной (10 ppm) и тяжелоизотопной воды (500000 ppm) приводил к одинаковым изменениям функционального состояния гипофизарно-тиреоидной оси, выражающееся в повышении активности щитовидной железы [Яглова и др., 2021]. Снижение концентрации дейтерия в организме лабораторных животных при потреблении ОДВ (10 ppm) в течение семи суток способствовало изменению их параметров терморегуляции тела [Яглова и др., 2021].

Следует обратить внимание на эксперименты, в которых исследуется влияние низких концентраций дейтерия на метаболизм простейших организмов. В питательной среде, приготовленной на ОДВ с концентрацией дейтерия 35 и 70 ppm, прирост в экспоненциальной фазе роста бактериальной культуры *Pseudomonas esterophilus* был больше на 87,3 и 35,2 % по сравнению со средой, приготовленной на воде с естественным содержанием дейтерия. Число клеточных делений этой культуры за один час было выше в легкоизотопной среде на 6,7 и 3,3 % соответственно [Назаров Н. М. др., 2011]. В питательной среде с концентрацией дейтерия 125 ppm образование углекислого газа пекарскими дрожжами было примерно в два раза больше по сравнению с контролем. При этом биомасса дрожжей, культивируемых в разных средах, была одинаковой. Данный факт свидетельствует об увеличении метаболизма дрожжей при их помещении в легкоизотопную по водороду среду [Першин С.М., 2017]. *Spirostomum ambigua* – спирально-ресничная инфузория, применяемая как тест – система для токсикологических и фармакологических

исследований [Dikstein S.,1976; Nalecz-Jawecki G.,1998]. Авторы следующего эксперимента [Syroeshkina A.V., et al, 2018] исследовали зависимость продолжительности жизни этой инфузории от концентрации ^2H в среде. Данная зависимость имела колоколообразную линию, максимум которой приходился от 90 до 200 ppm.

Подвижность сперматозоидов быка ингибировалась в средах, как с повышенным, так и с пониженным содержанием дейтерия [Киркина А.А. и др.,2014]. Максимальное замедление отмечалось при концентрациях дейтерия 10, 30 ppm и 5%. При концентрациях 60,90 ppm и 1 % подвижность половых клеток быка была на уровне контроля (150 ppm). Сперматозоиды человека наоборот, активировались в среде с D/H равной 4 ppm и были менее подвижны при концентрации 60 ppm. В этой работе также установлена, что выживаемость личинок вьюна в ОДВ достоверно выше по сравнению с контролем, тогда как выживаемость роговых катушек, наоборот, ниже в легкоизотопной воде относительно воды с природным содержанием дейтерия.

Проведенный анализ литературы, касающийся проблеме влияния низких концентраций дейтерия на биологические объекты, говорит о том, что изменение постоянства концентрации дейтерия в среде приводит к функциональным и морфологическим изменениям на клеточном, тканевом и целостном уровне организма, и способствует повышению адаптационных возможностей при действии стрессоров различной природы.

1.2 Стресс и стресс – лимитирующая система организма

Поддержание динамического постоянства внутренней среды – это важная задача живого. Под постоянством внутренней среды подразумевают сохранение физических, физико-химических и концентрационных параметров. У млекопитающих под такими параметрами подразумевается температура, кровяное и осмотическое давление, парциального давление кислорода и углекислого газа в крови и тканях, концентрация микро и макро – элементов,

уровень глюкозы и т.д. [Наточин Ю. В., 2017]. Для этой цели в ходе эволюции возникали и совершенствовались механизмы, выполняющие данную функцию, как в одиночной клетке, так и в целом организме. Смещение динамического равновесия внутренней среды под действием различных факторов (стрессоров) приводит к развитию стрессовой реакции организма [Bai J.J. et al, 2017]. Под стрессовой реакцией понимают комплекс физиологических процессов, направленных на восстановление гомеостаза [Filaretova L. et al, 2016]. Первую теорию стрессовой реакции предложил Уолтер Кэнон. Согласно этой теории, выброс адреналина в кровь запускает адаптационные реакции организма в ответ на стресс, усиливая работу сердца, мышц, легких и мозга через симпатoadреналовую систему, вызывая реакцию “борьба/бег” [Cannon W.B., 1929.]. В 1946 году канадский физиолог Ганс Селье обозначил стрессовую реакцию как общий адаптационный синдром и дал ему следующее определение. Общий адаптационный синдром – это общая неспецифическая нейрогормональная реакция организма на любое предъявленное ему требование [Селье Г., 1979]. Согласно Селье стресс – реакция развивается через гипофизарно-адреналовую систему. До работ Селье считалось, что каждый стрессор при действии на организм способен вызывать в нем различные по природе действия. Однако он первым показал, что в независимости от природы раздражающего стимула кора надпочечников выделяет одни и те же гормоны, действие которых направлено на адаптацию к ним. Именно гормоны этой системы, такие как адренокортикотропный гормон и глюкокортикоиды обеспечивают приспособление организма к меняющимся условиям.

Согласно современным представлениям стресс реакция сопровождается активацией стресс-системы, а также стресс-лимитирующей системой организма. Первая способствует реализации стресс реакции, а вторая сдерживает чрезмерную активацию стресс - системы. Стресс – система представлена центральным и периферическим отделом [Stratakis C.A. et al, 199].

Центральная система состоит из паравентрикулярных ядер гипоталамуса , продуцирующих кортиколиберин, вазопрессин и кортикотропин - рилизинг -

фактор, а также катехоламинергические нейроны ствола головного мозга. Периферический отдел - это эфферентная симпато-адреналовая и гипоталамо-гипофизарная система. Гипофиз, гипоталамус и кору надпочечников выделяют как гипоталамо-гипофизарно -адренокортикальную эндокринную ось. Кортиколиберин, выделяемый гипоталамусом, запускает нейрогуморальный ответ организма на действие стрессора [Aguilera G. et al, 2007]. Через этот гормон происходит активация секреции адренокортикотропного гормона (АКТГ) из гипофиза и, соответственно, глюкокортикоидов из надпочечников [Owens M.J.,1991]. Влияние глюкокортикоидов распространяется на все органы и ткани, способствуя организму противостоять действию стрессоров, обеспечивая его мобилизацию. Высвобождение глюкокортикоидов в кровь приводит к изменению процессов углеводного, липидного, белкового, водного и ионного обмена [Ландышев Ю.С., 2014]. Под действием этих гормонов происходит активация иммунной системы, а также изменение генной активности, ингибирование процессов развития и дифференцирования клеток [Кубасов Р.В., 2014]. Глюкокортикостероиды и кортизол способны влиять на процессы свободнорадикального окисления путем изменения экспрессии генов, ответственных за синтез ферментов антиоксидантной защиты [Filipović D. et al, 2009; Lee W. Y. et al, 2014].

Чрезмерное действие стрессовой реакции приводит к повышенному выбросу стресс - гормонов и развитию деструктивных процессов, приводящих в конечном счете к патологии. Деструктивными процессами можно считать активацию активных форм кислорода и перекисного окисления липидов в тканях, нарушение синтеза макроэргических соединений, увеличение концентрации ионов кальция, нарушение структуры биополимеров. Так при длительном стрессовом воздействии избыток глюкокортикостероидов способен подавлять нейрогенез и вызывать необратимые изменения в головном мозге [Целикам В.Э. и др., 2015; You J.M. et al, 2009]. Для снижения повреждающего эффекта стресс системы активируется стресс - лимитирующая система организма. Она представлена центральным и периферическим отделом.

Активизация как центральных, так и периферических стресс-лимитирующих структур, и механизмов ослабляет действие стресс-реакции, реализующееся на различных уровнях организации организма, обеспечивает включение срочных и долговременных механизмов их адаптации и повышение их резистентности. Центральный отдел представлен в виде ГАМК - и опиоид - ергической системой, а также дофамин, серотонин, глицин - ергическими системами [Малышев И.Ю., 1998]. ГАМК - и опиоид - ергическая система является скоплением нейронов, продуцирующих гамма - аминомасляную кислоту и опиоидные пептиды, обладающие тормозным действием на нейроны головного и спинного мозга. Так обе системы по механизму отрицательной обратной связи контролируют работу нейронов, вырабатывающих кортикотропин релизинг гормон, гормон аргининвазопрессин и норадреналин. Активация нейронов паравентрикулярных ядер гипоталамуса и катехоламинергических нейронов в ответ на развитие стресс - реакции приводит к стимуляции ГАМК - и опиоид - ергических нейронов, которые в свою очередь приводят к ингибированию центральной и периферической стресс - системы [Петрова Е.С. и др., 2013].

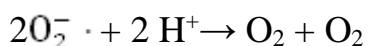
Второе звено этой системы называется локальной и состоит из антиоксидантной системы, белков теплового шока, NO - ергической системы [Меерсон Ф.З., 1993]. Оксид азота на ранних этапах адаптации способен ограничить развитие чрезмерной стресс - реакции и ее повреждающих эффектов за счет воздействия на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему, уменьшая выработку вазопрессина [Ota M. et al,1993]. Также NO - ергическая система способствует расширению сосудов органов и обеспечению кислорода и субстратов органов, ответственных за адаптацию. Установлено, что сорока дневная умеренная гипобарическая гипоксия способствовала постепенному увеличению концентрации метаболитов оксида азота - нитритов и нитратов в крови и тканях крыс [Малышев И.Ю., 1998]. На восьмой день эксперимента часть животных подвергали острой тяжелой гипоксии. При этом предварительная адаптация способствовала увеличению продолжительности

жизни в условиях острой гипоксии. Введение ингибитора NO - синтазы адаптированным животным приводило к сокращению продолжительности жизни. Наоборот, введение динитрозольных комплексов железа, являющихся донорами оксида азота, способствовало увеличению продолжительности жизни у адаптированных крыс в условиях острой гипоксии. Также этими авторами было установлено уменьшение площади язвенных поражений слизистой оболочки желудка при иммобилизационном стрессе на фоне предварительной адаптации. Максимальное снижение язвенных поражений наблюдалось у животных, которые были одновременно подвергнуты адаптации и влиянию донора оксида азота. Введение ингибитора NO - синтазы снимало эффект адаптации.

Воздействие любого стрессора на организм приводит к избыточному образованию активных форм кислорода и активации процессов перекисного окисления липидов и развитию, таким образом, окислительного стресса [Кулинский В. И., 1999]. Активация свободнорадикальных процессов в клетках организма способствует развитию ряда патологических процессов, ведущих к нарушению целостности клеток [Ortiz G.G. et al, 2017; Ohl K. et al ,2016]. Для защиты от пагубного воздействия свободных радикалов организм использует антиоксидантную систему. АОС организма можно разделить на специфическую и неспецифическую [Абрамова Ж. И., 1985]. Действие неспецифической АОС направлено на предотвращение условий и возможностей утечки электронов и образования АФК в ходе редокс – реакций. Например, предотвращение реакции Фентона путем связывания металлов переменной валентности с высокомолекулярными веществами - альбуминами [Gutteridge J.M., 1993; Fanali G. et al, 2012]. Специфическое звено АОС состоит из высокомолекулярных и низкомолекулярных компонентов, действие которых направлено на ликвидацию АФК и продуктов их деятельности. К высокомолекулярным компонентам относят ферменты, основными представителями которых являются СОД, каталаза, ГП и ГР [Fukai T. et al, 2011]. К низкомолекулярным относят вещества не

ферментативной природы – глутатион и вещества, в составе которых имеются тиоловые группы, а также витамины Е, С, А и убихиноны [Зозуля, 2000].

СОД образуется во всех аэробных организмах и является ферментом, первой линии защиты АОС, т.к. катализирует реакцию дисмутации первичного радикала - супероксида анион радикала до пероксида водорода и молекулярного кислорода, предотвращая развитие вторичных радикалов – гидроксильного радикала, гипохлорита и пероксинитрита [Fridovich I.,1997].



В организме млекопитающих СОД представлена в виде двух изоформ. Первая Cu, Zn – СОД или СОД₁ имеет молекулярную массу около 33,2 кДа и состоит из двух субъединиц [Hartz J. W., 1969]. Каждая субъединица имеет в своем составе ион меди и цинка, а также дисульфидную связь [Weisiger R. A.,1973]. Катион меди непосредственно принимает участие в редокс – реакции, а катион цинка необходим для стабилизации структуры фермента. Большая роль в структуре СОД₁ уделяется внутрисубъединичной дисульфидной связи между Цист. -57 и Цист. - 146. Эта связь обеспечивает стабильность четвертичной структуры и необходима для полной каталитической активности, поскольку она закрепляет положительно заряженную боковую цепь аргинина, которая направляет супероксид в активный сайт [Borders C.L., 1980; Hart P.J., 2006]. Предполагается, что способность СОД сохранять свою каталитическую функция при постоянном воздействии окислителей, в первую очередь пероксида водорода, может быть также связана с ее эволюционно – консервативной дисульфидной связью [Tiwari M. K. et al, 2019]. Установлено, что окислительному воздействию со стороны образующегося пероксида водорода подвергается Цист. -147 при этом сама дисульфидная связь не разрывается. Однако чрезмерная атака активных форм кислорода все же может стать причиной разрыва дисульфидной связи и выходу ионов меди и цинка. Высвободившие ионы меди будут инициировать реакцию Фентона с образованием гидроксильного радикала, и усиливать тем самым окислительный

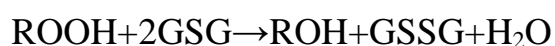
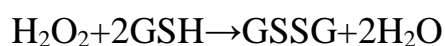
стресс [Stadtman E.R., 1998]. В мутантных формах СОД дисульфидная связь более чувствительна к химическому восстановлению по сравнению с ферментом дикого типа. Это приводит к неправильной конформации молекулы СОД, образованию белковых агрегатов и развитию нейродегенеративных заболеваний [Shaw B.F. 2007; Rosen D.R. et al, 1993]. Данная форма СОД встречается в ядрах, цитоплазматическом матриксе, межмембранном пространстве митохондрий и лизосомах печени [Chang L.Y. et al,1988; Sturtz L.A. et al,2001; Kira Y. et al,2002]. Экстрацеллюлярная Cu, Zn – СОД (СОД₃) встречается исключительно во внеклеточном пространстве и представляет собой белок более сложной структурой, состоящей из четырех субъединиц и шести остатков цистеина [Oury T.D. et al, 1996]. Третья изоформа СОД – это Mn-СОД или СОД₂ встречается преимущественно в митохондриальном матриксе. Представляет собой белок молекулярной массой 39,5 кДа [Miller Anne-Frances,2012]. Несмотря на низкое содержание СОД в мозге по сравнению с другими тканями (в 5 - 7 раз меньше чем в печени), этот фермент обеспечивает защиту мозга при окислительном стрессе [Nakano M.,1990].

В организме млекопитающих имеется два фермента, осуществляющих реакцию разложения пероксида водорода на воду и молекулярный кислород $H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$.

Первый из них каталаза представляет собой гемсодержащий фермент, состоящий из четырех идентичных субъединиц и молекулярной массой 244 кДа [Брюханов А.Л.,2004]. Данный фермент встречается практически во всех тканях млекопитающих. Наибольшая активность наблюдается в печени, где она локализована в пероксисомах, а также эритроцитах крови. В мозге ее активность низкая, по одним данным на 10 % ниже, чем в печени, по другим в два раза [Chong Z.Z.,2005; Ho Y.S. et al,1997]. В разных структурах головного мозга активность каталазы разная. Наименьшая активность наблюдается в коре головного мозга, несколько выше концентрация фермента в гипоталамусе, мозжечке и продолговатом мозге [Галкина О. В.,2013]. Каталаза обладает бифункциональной активностью, т.е. может разлагать перекись водорода по

двум различным путям. В первом случае фермент разлагает пероксид водорода до воды и триплетного кислорода (каталазное действие). Во втором случае – катализирует окисление перекисью водорода различных эндогенных и экзогенных субстратов, например, этанола, метанола, формиата и других (пероксидазное действие) [Oshino N. et al, 1979]. Каталаза имеет низкое сродство к пероксиду водорода [Колесниченко В.В.,2011], поэтому каталазное действие регистрируется при относительно высокой концентрации перекиси, пероксидазное – при более низких уровнях содержания перекиси водорода в клетке [Kodydková J. et al,2014]. Активность каталазы может быть инактивирована в тканях свободным гомоцистеином, концентрация которого резко повышается в тканях при развитии рака и ряда нейродегенеративных процессов [Peřla-Kaján J. et al,2007; Kwon H.M. et al,2014]. Гомоцистеин способен к взаимодействию с каталазой с образованием сульфокаталазы – необратимого неактивного состояния фермента [Padovani D., 2016], что приводит к развитию дисфункциональности каталазы и как следствие отягощению окислительного стресса [Seabra A. 1955; Sen S.,2012]. При патологических условиях включаются адаптивные механизмы, и каталаза начинает играть важную роль в приобретении клеткой устойчивости к окислительному стрессу.

Вторым ферментом, проявляющим пероксидазную активность в организме, является глутатионпероксидаза. Глутатионпероксидаза восстанавливает пероксид водорода до воды, используя глутатион в качестве ко субстрата [Калинина Е.В. и др.,2014]. В активном центре ГП содержится селен, связь которого с аминокислотой цистеином способствует большому сродству к пероксиду водорода. Кроме того, ГП катализирует реакцию восстановления глутатионом нестойких органических гидропероксидов, включая гидропероксиды полиненасыщенных жирных кислот.



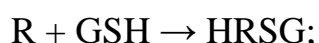
В связи с тем, что родство ГП к пероксиду выше, чем для каталазы, этот фермент способен обезвреживать не большие концентрации пероксида водорода. Например, в мозге активность каталазы низкая, поэтому основная роль на ликвидацию перекиси водорода уделяется ГП. При этом основная нагрузка ГП в мозге (около $\frac{3}{4}$) приходится на разложение образующихся гидроперекисей. Тогда как в печени основная функция ГП – это разложение перекиси водорода (около 65 %) [Hayes J.D. et al,1989]. В организме млекопитающих обнаружено восемь изоформ ГП [Brigelius-Flohé R.,2013]. Причем все они за исключением 5, 7 и 8 являются селенсодержащими. Первая изоформа – ГП1 или классическая ГП. Первое упоминание о ней появляется в 1957 г [Mills G.C., 1957]. Наибольшая активность проявляется в печени, легких, почках и эритроцитах [Flohé L.,1989]. Представляет собой белок, состоящий из 4 -х субъединиц с молекулярной массой 21 кДа каждая [Herbette S. et al,2007]. В клетке в основном локализована в цитозоле, ядре и митохондриях. ГП2 или желудочно – кишечная была открыта в 1993 г желудочно-кишечном тракте [Chu F.F. et al,1993]. Также, как и ГП1 является тетрамером с молекулярной массой субъединицы 22 кДа. Проявляет свою наибольшую активность в цитоплазме и ядре клеток кишечника, желудка и печени. Следующая разновидность ГП3 (плазматическая) – состоит из 4 –х субъединиц молекулярной массой 25,5 кДа каждая [Herbette S. et al ,2007]. ГП3 является секретлируемым белком и проявляет свою антиоксидантную активность во внеклеточном пространстве [Takahashi K. et al,1997]. Встречается в почках, легких, придатках, плацента, сердце, мышца. Первое упоминание приходится на 1987 г [Takahashi K. et al,1997]. ГП4 является единственным членом семейства, проявляющим свою активность в отношении мембраносвязанных гидропероксидов, например, восстанавливая гидроксид фосфатидилхолина и играющим решающую роль в сперматогенезе [Thomas J.P. et al,1990; Ursini F. et al,1999; Yant L.J. et al,2003]. Представляет собой мономер богатый гидрофобными аминокислотными остатками необходимыми для взаимодействия с мембранами. ГП1, ГП2 и ГП4 задействованы в активации

транскрипционного фактора (NF- κ B) [Yant L.J. et al,2003]. Так у мышей нокаутных по ГП1 развивалась усиленная воспалительная реакция в модели эндотоксемии по сравнению с диким типом мышей [Jaeschke H. et al,1999]. У грызунов с двойным нокаутом генов, кодирующих ГП1 и ГП2 развивалась болезнь Крона [Esworthy R.S. et al,2003]. Клетки аденокарциномы толстого кишечника с недостатком селена обладали пониженной активностью ГП1 и повышенную активность NF- κ B, опосредованную фактором некроза опухоли [Gong G. et al,2012]. У эндотелиальных клеток, сверхэкспрессирующих ГП1 и ГП4, была обнаружена чрезмерная активация NF- κ B [Kretz-Remy C. et al,1996; Brigelius-Flohé R. et al,1997]. Также мыши с нокаутным геном по ГП2 имели повышенную активность фактора некроза опухоли и индуцируемой NO - синтазы в кишечнике [Solveigh C. et al, 2020]. ГП5 открыта в 1989 г. представляет собой димер с молекулярной массой субъединицы 24 кДа [Ghyselinck N.B. et al,1989; Herbette S. et al,2007], является первой обнаруженной изоформой не содержащей селен. Данный фермент обнаружен в эпидидимисе как секретируемый белок [Drevet J.R.,2006]. Шестой член суперсемейства – ГП6 – был обнаружен в обонятельном эпителии [Dear T.N. et al,1991]. Еще одной изоформой, обнаруженной у млекопитающих, является ГП7. В связи с тем, что ГП7 не обладает селенцистеиновым комплексом в активном центре ее пероксидазная активность снижена [Dear T.N. et al,1991]. Между тем ее функции сводятся к сигнальной молекуле. Так ГП 7 выступает в качестве сигнальной молекулы при окислительном стрессе и способствует активации шаперона GRP – 78, отвечающей правильной сборке поврежденных белков [Wei P.C. et al,2012]. Также ГП7 подавляет развитие аденокарциномы пищевода [Peng D. et al,2014]. Последний представитель семейства глутатионпероксидаз это ГП8. Представляет собой мембранный белок эндоплазматического ретикулума функции которого мало изучены. Предполагается, что его функции также, как и ГП7 сводятся к сигналингу некоторых процессов [Banning A. et al,2005].

Еще одним представителем глутатионовой системы является фермент глутатион – трансфераза, представляющий собой гомо – и гетеродимеры [Allocati N. et al,2018]. В каждом мономере ГТ распознаются два разных домена: N-концевой тиоредоксин – подобный домен и С - концевой альфа-спиральный домен. Первый домен отвечает за связывание глутатиона с конкретной молекулой и называется G-сайт. В пределах этого сайта определенный остаток активирует боковую цепь цистеинила глутатиона посредством водородной связи. В некоторых классах этот остаток представляет собой тирозин, а в некоторых других представляет собой серин или цистеин. У людей изоферменты альфа, мю, пи и сигма содержат тирозин в G-сайте, в то время как другие классы - серин или цистеин. Митохондриальные ферменты класса каппа, содержат серин в G-сайте. С-концевой домен вместе с N-концевым доменом способствует формированию сайта связывания - субстрата, который называется H-сайтом, из гидрофобной природы ко - субстратов. Большая изменчивость субстратов ГТ отражена в различных формах H-сайтов и химических характеристиках, обнаруживаемых среди классов. Суперсемейство ГТ подразделяется на три типа: цитозольные, митохондриальные и микосомальные [Hayes J.D. et al,2005]. Цитозольные ГТ имеют наибольшее разнообразие [Sheehan D. et al,2001]. У млекопитающих на основании схожести аминокислотной последовательности выделяют семь представителей цитозольной ГТ: альфа, дзета, тэта, мю, пи, сигма и омега [Oakley A.,2011]. Этот фермент проявляет пероксидазную активность в отношении гидропероксидов полиненасыщенных жирных кислот, фосфолипидов, простагландинов и пероксидов ДНК восстанавливая их до спиртов и защищая, таким образом, клетки при окислительном стрессе [Whalen R.,1998; Lin Y.S. et al,2009]. ГТ конъюгирует глутатион с широким спектром ксенобиотиков, включая многие канцерогены и терапевтические препараты, что делает их менее токсичными для организма. Так, ГТ способна нейтрализовать действие афлотоксина В1, образуемого грибами *Aspergillus*; акролеина – высокореактивного альдегида, используемый в химической промышленности и

сельском хозяйстве, а также образуемый при сжигании табака, пластмассы и топлива [Wild C.P. et al,2002; Stevens J.F.,2008; Dohnal V.et al,2014]. Многие противораковые препараты являются субстратами для ГТ, что вызывает устойчивость раковых клеток к химиотерапии [Morrow C.S. et al,1998; Lien S. et al,2002]. ГТ осуществляет четыре основных типа реакций [Кулинский В.И.,2009]:

1) присоединение к субстрату полной молекулы глутатиона:



2) нуклеофильное замещение: $RX + GSH \rightarrow RSG + HX$;

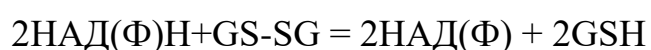
3) восстановление органических пероксидов (гидропероксидов жирных кислот) до соответствующих спиртов:



4) изомеризация (стероидов, простагландинов).

Не малую роль ГТ играет во внутриклеточной сигнализации, контролируя гибель и пролиферацию клеток через митоген – активируемый киназный путь (MAPK) [Adler V. et al,1998; Laborde E.,2010]. Различные виды рака, такие как, рак молочной железы, толстой кишки, почек, яичников и легких экспрессируют высокие уровни цитозольной ГТ, что делает ее перспективной мишенью в терапии рака [Tidefelt U. et al,1992; Howells R.E. et al,2004]. Развитие нейродегенеративных заболеваний тесно коррелирует с нарушением активности ГТ в тканях головного мозга. Так снижение уровня ГТ во всех отделах головного мозга наблюдалось у людей, скончавшихся от болезни Альцгеймера [Howells R.E. et al,2004]. Начальная стадия развития болезни Паркинсона коррелирует со снижением активности ГТ, тогда как более поздняя, наоборот, с повышением экспрессии генов, кодирующих ГТ [Mazzetti A.P. et al,2015].

Разложение гидроперекисей и ксенобиотиков с участием глутатиона требует его постоянно восстановления из окисленной формы. Данный процесс в организме осуществляет глутатионредуктаза.



Глутатионредуктаза представляет собой флавопротеин, содержащий ФАД в качестве простетической группы. Фермент является гомодимером с молекулярной массой около 104 кДа, при этом в каждой субъединице выделяют 3 домена: НАДФН-связывающий, ФАД-связывающий и домен димеризации [Masella R. et al,2005]. При нейродегенеративных процессах в мозге наблюдается повышенная активность ГР в крови и тканях мозга [Дубинина Е.Е. и др.,2007; Незнанов Н.Г. и др.,2013].

Глутатион представляет собой трипептид, образованный остатками трёх аминокислот - глутаминовой кислоты, цистеина и глицина. Он играет ключевую роль в защите клеток и внутриклеточной среды от реакционноспособных интермедиаторов кислорода, образующихся при метаболизме ксенобиотиков, действии ионизирующей радиации и окислительном стрессе иной природы [Toledano M.V. et al,2017].

Будучи главным небелковым тиолом клетки, GSH является основным донором тиоловых групп; он активирует SH-группы аденилатциклазы и способствует повышению внутриклеточной концентрации цАМФ [Zhang H.,2012]. При защите мозга от оксидативного стресса GSH играет главную роль, взаимодействуя непосредственно с АФК, а также участвуя в ряде ферментативных окислительных реакций [Berndt C.,2017].

Биологическая роль глутатиона многообразна и реализуется как посредством активации глутатионзависимых ферментных систем, так и непосредственно системой $2\text{GSH} - \text{GSSG}$. Имеются данные о влиянии глутатиона на такие процессы как пролиферация, дифференциации и апоптоз клеток [Monks T.J. et al,1999]. Показано, что уменьшение концентрации GSH отрицательно сказывается на экспорте АТФ митохондриями нейронов мозжечка [Vesce S. et al,2005]. Глутатион содержится внутри клеток, причём подавляющая его часть представлена восстановленной формой, содержание окисленной формы не превышает 1% от восстановленной формы [Dringen R.,2000]. В ткани мозга его содержание составляет около 1-3 мМ, что примерно в три раза меньше, чем в печени [Slivka A. et al,1987]. Часть глутатиона внутри

клеток обычно существует в форме смешанных дисульфидов с белками (порядка 5 или даже 35% всего GSH) [Steinmeier J. et al,2019], а также в виде соединения с коэнзимом А [Sies H. et al,1995]. Это внутриклеточные резервы GSH, высвобождающиеся в условиях напряжённого функционирования в экстремальных ситуациях и повышающие мощность глутатионовой АОС [Davies M. et al,1987].

Между отделами мозга глутатион распределён неравномерно. Наибольшее его количество было обнаружено в коре, гиппокампе и мозжечке. Глутатион неравномерно распределяется между клетками ЦНС. Содержание GSH в телах нейронов достаточно низкое, тогда как концентрация его в астроцитах относительно высока [Makar T.K. et al,1994]. В других глиальных клетках, таких как олигодендроглиях и микроглиях содержание глутатиона выше, чем в нейрональных клетках, но ниже, чем в астроцитах [Rana S. et al,2007]. Предполагается, что именно астроциты берут на себя главную атаку со стороны АФК при окислительном стрессе. В моделях *in vitro* было показано, что один астроцит способен защитить около 20 нейронов от гибели при повышенном радикалообразовании [Dringen R. et al,200].

Таким образом, в ходе эволюции организм был всегда подвержен воздействию внешних факторов среды, что способствовало развитию определенных реакций организма, способствующих его выживанию.

1.3 Патофизиологические механизмы повреждения головного мозга при гипоксических/ишемических состояниях.

Гипоксия представляет собой патологический процесс, связанный с неадекватным снабжением тканей кислородом и при нарушении его утилизации в них в процессе биологического окисления, которое возникает при воздействии различных внешних и внутренних факторов, в том числе связанных с развитием патологических процессов в организме [Ветровой О.В. и

др.,2017]. По чувствительности к гипоксии органы выстраиваются следующим образом: мозг – сердце – почки – печень [Rauchová H. et al,2012].

Выделяют четыре типа гипоксии [Воронина Т. А.,2016]. Первый тип гипоксии, называемый гипоксемия, связан со снижением парциального давления кислорода в артериальной крови и тканях. Анемическая гипоксия возникает вследствие снижения транспортной доставки кислорода к тканям на фоне нормального парциального давления кислорода, вызванной снижением гемоглобина или недостатком эритроцитов. Третий тип гипоксии называется циркуляторной. Данный процесс развивается при недостаточном кровотоке к тканям и органам. Последний тип гипоксии – гипоксидоз, обусловлен нарушением работы ферментов дыхательной цепи митохондрий, что приводит к недостаточной утилизации молекул кислорода. Наиболее распространенными заболеваниями, связанными с гипоксией, являются ишемическая болезнь сердца и инсульт головного мозга. Ишемия представляет собой циркуляторную гипоксию, при которой дефицит кислорода происходит из-за полного или частичного прекращения поступления крови в данный участок органа [Sasaki N. et al,2019].

Ишемический инсульт среди смертности населения занимает третье место после онкологических заболеваний и инфаркта миокарда. В РФ частота инсультов по разным данным составляет 350 – 400 случаев на 1000 лиц населения [Титов Б.В. и др.,2015]. В США более 600000 человек в год переносят инсульт [Sacco R.L.,1997]. Данное заболевание имеет социально – экономическое значение, т.к. одна треть перенесших инсульт людей приходится на трудоспособный возраст.

Гипоксия/ишемия на начальном этапе приводит к снижению концентрации кислорода в митохондриях нейронов, что приводит к нарушению синтеза макроэргических соединений. Уменьшение концентрации АТФ и одновременное увеличение уровня АДФ и АМФ приводит к активации фосфофруктокиназы. Данный фермент запускает процесс гликолиза, что сопровождается увеличением концентрации лактата в клетках головного мозга.

На первых этап аноксического состояния данный эффект способствует адаптации и восстановлению энергообеспечения за счет распада гликогена [Бурчинский С. Г.,2014]. Избыточное накопление лактата, вследствие выброса катехоламинов и глюкокортикоидов, а также усиления гидролиза АТФ над ее синтезом способствует накоплению в клетке протонов. В результате двух этих событий происходит снижение внешнего и внутриклеточного рН, такой процесс называется ацидозом. Вызванный ацидоз способствует ингибированию фермента фосфофруктокиназы и прекращению процесса резервного энергообеспечения. В нормальном физиологическом состоянии рН во внеклеточном пространстве нейронов варьирует от 7,31 – 7,24, тогда как внутри нейрона 7,05 – 6,98. При ишемии/гипоксии значения внешнего водородного показателя составляют 7,0 – 6,43, а значения внутреннего 6,86 – 6,15. Моделирование ацидоза *in vitro* (снижение $[H^+]$ до 6,5 – 6,0) в клеточных культурах нейронов мозжечка и гиппокампа в условиях нормоксии приводило к апоптотической и некротической гибели клеток [Исаев Н.К. и др.,2008].

Na^+/K^+ - АТФ - аза является самым энергозатратным ферментом, работа которого напрямую зависит от концентрации АТФ в клетке [Askari A.,2019]. Изменение активности этого фермента приводит к избыточному накоплению ионов натрия внутри клетки, что может послужить ряду патологических процессов в нейронах головного мозга. Один из них чрезмерное высвобождение глутамата в синаптическое пространство нейронов. Его концентрация в клетке 0,6 – 2,0 мкМ поддерживается транспортёр глутамата (ЕААТ, excitatory amino acid transporter) [Benveniste H. et al,1984]. Транспорт глутамата – это сложный многоступенчатый процесс переноса глутамата из синаптической щели в астроциты, сопряженный с входом трех ионов натрия и выходом одного иона калия. При увеличении соотношения Na^+/K^+ внутри клетки ЕААТ начинает работать в обратном направлении, увеличивая концентрацию глутамата во внеклеточном пространстве [Курбаш М.Н.,2009]. Так, десятиминутная моделируемая *in vitro* ишемия вызывала увеличение глутамата до 30 мкМ в культуре нервной ткани [Choi D.W. et al,1987]. Также

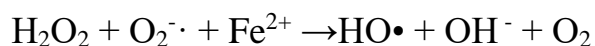
чрезмерное накопление ионов натрия в клетке вследствие дисфункции Na^+/K^+ - АТФ – азы приводит к деполяризации мембраны и активации Ca^{2+} каналов.

Нейротоксический эффект глутамата связан главным образом с активацией ионотропных NMDA и AMPA – рецепторов [Waxman E. A.,2005; Suda S.,2019]. Активация этих рецепторов способствует дальнейшей деполяризации мембраны, а также усилению пула ионов кальция из межклеточного пространства через ионные каналы цитоплазматической мембраны и выбросу внутриклеточного кальция из эндоплазматического ретикулума (ЭПР) [Rueda C.B. et al,2016]. Концентрация ионов кальция в цитозоле клетки очень низкая и составляет от 50-100 нм, тогда как в ЭПР содержание Ca^{2+} на три – четыре порядка выше и составляет 100-500 мкм [Заводник И.Б.,2016]. Выход кальция из внутриклеточных депо (ЭПР) происходит по инозиттрифосфатному рецепторному пути. Взаимодействие глутамата с метабатропными (m-Glu) - рецепторами способствует активации семейства фосфолипаз C. Последние катализируют распад мембранных фосфолипидов – трифосфоинозитидов (ТФИ) с образованием двух вторичных мессенджеров. Первый из них инозитол – 1,4,5 – трифосфат (IP3), который взаимодействует с IP3 – рецепторами мембраны ЭПР, и в результате этого процесса осуществляется выход Ca^{2+} по электрохимическому градиенту из этого органоида в цитоплазму клетки. Вторым продуктом гидролиза (ТФИ) является 1,2 – диаглицерин, который служит источником арахидоновой кислоты [Stanimirovic D.,2000]. В результате ишемии происходит увеличение концентрации ГАМК. Этому медиатору отводится протекторная функция в острый период ишемии. Накопление арахидоновой кислоты и внутриклеточного кальция, а также нарушенный синтез АТФ способствует нарушению ГАМК – ергической системы мозга [Schwartz R. et al,1988]. Избыток кальция в клетке приводит к чрезмерной активности Ca^{2+} - зависимых ферментов (протеиназные, фосфолипазные, NO – синтаза, киназы), которые, в конечном счете, приводят к разрушению мембран, изменению транскрипции, изменению проводимости ионных каналов и т.д.

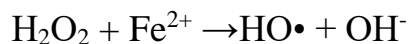
Ишемия/гипоксия способствуют развитию в тканях головного мозга окислительного стресса, который является важнейшим повреждающим фактором нейронов [Sinning C. et al,2017].

Головной мозг обладает необходимыми предпосылками для развития в нем свободнорадикальных процессов. Это обусловлено, высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот, слабой активностью глутатионпероксидазы и каталазы, высоким содержанием железа и низкой концентрацией витамина А [Siesjo, E. et al,1992]. В условиях гипоксии происходит утечка электронов в комплексах 1,3 дыхательной цепи митохондрий и переносу их на молекулярный кислород, что приводит к образованию супероксид анион радикала – первичного радикала, ведущего к дальнейшему образованию остальных высокореакционных молекул [Kalogeris T. et al,2014]. Образованию супероксиданионного радикала в постишемическом периоде способствует переход ксантиндегидрогеназы в ксантиноксигеназу. Вызванная гипоксией продукция супероксиданиона также происходит за счет активации НАДФН – оксидазы. Ацидоз, вызванный на фоне аноксии, приводит к изменениям в структуре и, следовательно, к нарушениям функциональной активности ферментов антиоксидантной защиты, способных утилизировать АФК, образующиеся в клетке. Во многих экспериментальных работах установлено, что гипоксия/ишемия приводит к разбалансированной работе ферментов АОЗ. Так при гипоксии происходит активация экспрессии генов, кодирующих СОД [Строев С. А. и др.,2012]. Активность каталазы меняется в зависимости от тяжести гипоксии. Ген, кодирующий ГП, содержит кислородзависимые участки, поэтому снижение парциального давления в тканях кислорода способствует подавлению экспрессии данного гена [Merante F. et al,2002]. Нарушение функций этих ферментов может привести к избыточному накоплению супероксиданион радикала и пероксида водорода. Уменьшение внутри и внеклеточного рН способствует выходу связанного с белками железа. Взаимодействие этих двух радикалов с ионами свободного железа приводит к более сильному развитию последствий окислительного

стресса за счет образования агрессивного гидроксильного радикала [Yang W.S. et al,2016]. Это происходит за счет протекания реакции Габера – Вайса:



и реакции Фентона:



Понижение pH в клетке и во внеклеточном пространстве способствует взаимодействию между протоном и супероксиданион радикалом с образованием не менее токсичного $\text{HO}_2\cdot$ радикала. Активация Ca^{2+} - зависимой NO – синтазы (эндотелиальной и нейрональной), на фоне кальциевой перегрузке, увеличивает содержание оксида азота в клетках головного мозга. Данное явление может иметь как положительные, так и отрицательные последствия. Защитное действие оксида азота связано с расширением сосудов, торможением агрегации тромбоцитов, а также блокадой NMDA – рецепторов за счет взаимодействия с их тиоловыми группами [Lipton S.A.,2004]. Отрицательный эффект гиперпродукции NO приводит к образованию агрессивного радикала – пероксинитрита.

Чрезмерное накопление внеклеточного дофамина и арахидоновой кислоты, могут усугублять последствия окислительного стресса. Аутоокисление дофамина происходит с образованием супероксиданион радикала и пероксида водорода [Yang Z.J. et al,2003]. Токсическое действие арахидоновой кислоты связано со способностью ее метаболитов генерировать супероксиданион радикал. Повышение каталитической активности фосфолипаз при глутаматной токсичности и чрезмерное образование активных форм кислорода и азота способствует развитию перекисного окисления липидов. Под действием пероксинитрита, супероксиданиона и гидроксильного радикала, а также ряда других АФК происходит окисление не только фосфолипидов, но и окисление различных белковых компонентов мембран нейронов [Brown H.A.,2009]. В белковых структурах окислению подвергаются сульфгидрильные

группы цистеина и метионина. Окислительному повреждению подвергаются азотистые основания ДНК клетки [Garbarino V. R. et al,2015].

Развитие воспалительных реакций в тканях мозга и повреждение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) являются отдаленными последствиями ишемии/гипоксии. Нарушения ГЭБ присутствуют с первых минут острой фокальной ишемии, наиболее выраженными становятся через несколько часов [Block F.,1996]. Воспаление главным образом возникает за счет миграции нейтрофилов из сосудов в ткань и активации микроглиальных клеток [Anderson S.R. et al,2019]. Клетки микроглии экспрессируют разнообразные провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухолей, интерлейкины-1,6, а также цитотоксические метаболиты [Siddiqui T.A.,2016]. На фоне активированного микроглиями фагоцитоза происходит усиление индуцибельной NO – синтазы [Ashley McDonough et al,2017]. Оксид азота, вырабатываемый индуцибельной NO – синтазой, выделяется в больших количествах и отягощает развитие патологического процесса.

Вызванные на фоне аноксии мозга ацидоз, глутаматная токсичность и гиперпродукция активных форм кислорода и азота способствуют запуску запрограммированной смерти нейронов – апоптозу [Fricker M.,2018]. Вызванная гибель нейронов головного мозга способствует нарушению интегративных связей нейронов. Данные процессы приводят к тяжелым неврологическими последствиям, к которым относится продолжительная депрессия, ослабление и подавление когнитивных функций ЦНС [Kalaria R. N.,2016; Paolucci S. et al, 2019].

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТ И МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Содержание и кормление животных

В работе использовали крыс линии Вистар разной возрастной категории в зависимости от вида исследований. Поведенческие тесты и биохимические исследования были выполнены на 3 - х месячных самцах крыс массой 280 - 310 грамм. Для культуральных исследований использовали 7 - 9 - ти дневных крысят, родившихся от самок 5 - 6 месяцев.

Электрофизиологические исследования были проведены на самцах крыс в возрасте 5- 6 недель массой 100- 150 грамм.

Контрольные и опытные животные содержались в одном виварии при одинаковых условиях и имели свободный доступ к корму и воде. Опытные животные получали отчищенную и минерализованную воду с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm), а в рационе контрольных животных была отчищенная и минерализованная вода с природным содержанием дейтерия (150 ppm). Минерализацию воды осуществляли путем добавления в нее минеральных солей для получения физиологически полноценного минерального состава (минерализация 314–382 мг/л: гидрокарбонаты 144- 180, сульфаты <1, хлориды 60 - 76, кальций - 6, магний - 3, натрий 50 - 58, калий 50 - 58).

2.2 Схемы экспериментов

2.2.1 ЯМР исследования сыворотки крови и масс – спектрометрические исследования тканей головного мозга крыс

Эксперимент был выполнен на 66 крысах по следующей схеме. Животных разделили на две группы:

1 группа (n=33) - крысы, которые получали воду с природным содержанием дейтерия (150 ppm);

2 группа (n=33) - крысы, которые получали ОДВ.

Из каждой группы животных выводили по 3 крысы каждый день в течение недели, затем на 10, 15, 21, 40 и 56 сутки для забора крови путем декапитации. Из полученной крови готовили сыворотку и определяли в ней концентрацию дейтерия на ЯМР - спектрометре (JEOL JNM-ECA 400 MHz). На 40 и 56 день эксперимента извлекали головной мозг и подвергали его лиофильной сушке для дальнейшего определения содержания дейтерия в нем с помощью масс – спектрометра DELTA^{plus} (Finnigan, Германия).

2.2.2 Биохимические и поведенческие исследования

Биохимические тесты были выполнены на 56 крыс, которые были разделены на 8 групп:

группа 1А - интактные крысы (n=7), которые получали в рационе воду с концентрацией дейтерия равной естественной (150 ppm) в течение двух недель, при этом гипоксия у них не моделировалась;

группа 1В - интактные крысы (n=7), которые получали в рационе воду с концентрацией дейтерия равной естественной (150 ppm) в течение шести недель, при этом гипоксия у них не моделировалась;

группа 2 - крысы (n=7), которые получали в рационе ОДВ (50 ppm) в течение двух недель;

группа 3 - крысы (n=7), которые получали в рационе воду с концентрацией дейтерия равной естественной (150 ppm) в течение двух недель, при этом, на 15 день эксперимента им моделировали острую гипоксию;

группа 4 - крысы (n=7), которые получали в рационе ОДВ (50 ppm) в течение двух недель, при этом, на 15 день эксперимента им моделировали острую гипоксию;

группа 5- крысы (n=7), которые получали в рационе ОДВ (50 ppm) в течение шести недель;

группа 6 - крысы ($n=7$), которые получали в рационе воду с концентрацией дейтерия равной естественной (150 ppm) в течение шести недель, при этом, на 43 день эксперимента им моделировали острую гипоксию;

группа 7 - крысы ($n=7$), которые получали в рационе ОДВ (50 ppm) в течение шести недель, при этом, на 43 день эксперимента им моделировали острую гипоксию.

Через сутки после моделирования гипоксии под общей анестезией, выполняемой препаратом Золетил 100 («Virbac», Франция) в дозировке 15 мг на 1 кг массы тела крысы внутримышечно, у крыс проводили декапитацию (группы 1А, 2, 3, 4- на 15 сутки; группы 1В, 5, 6, 7 на 43 сутки эксперимента), после чего головной мозг извлекали и помещали в жидкий азот. Из тканей мозга готовили супернатант. Концентрацию МДА и СРО измеряли во всех группах животных. Активность каталазы, СОД, ГР, ГП, а также уровень восстановленного глутатиона изучали только в группах 1В, 5, 6, 7.

Функциональные исследования были выполнены на 28 животных, разделенных на 4 группы:

группа 1 (контроль) - интактные крысы ($n = 7$), получавшие в рационе воду с концентрацией дейтерия равной естественной (150 ppm) в течение шести недель, без гипоксического воздействия;

группа 2 - крысы ($n = 7$), получавшие в рационе ОДВ (50 ppm) в течение шести недель, без гипоксического воздействия;

группа 3 - крысы ($n = 7$), получавшие в рационе воду с концентрацией дейтерия равной естественной (150 ppm) в течение шести недель, на 43 день эксперимента подвергнутые острой гипоксии;

группа 4 - крысы ($n = 7$), получавшие в рационе ОДВ (50 ppm) в течение шести недель, на 43 день эксперимента подвергнутые острой гипоксии.

На следующий день после гипоксии функциональное состояние животных оценивали с помощью тестов «приподнятый крестообразный лабиринт» и «Т-образный лабиринт».

Гипоксию моделировали путем помещения крыс в герметичный сосуд объемом 1 литр. Животные находились под постоянным наблюдением до первого агонального вдоха [Новиков В.Е. и др., 2012; Карпова И.В. др.,2014].

2.2.3 Электрофизиологические и культуральные исследования

В электрофизиологических исследованиях действие среды с различным содержанием дейтерия изучали путем переключения системы протока с резервуара, содержащего ИСП1 на резервуар с ИСП2. По истечении 10 минут производили обратное переключение на резервуар с ИСП1. ИСП1 был приготовлен на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm), а ИСП2 приготавливался на ОДВ с концентрацией дейтерия 50 ppm. Оба раствора имели одинаковый состав.

Действие ОДВ на культуру нервной ткани оценивали в двух инкубационных средах. Первая была приготовлена на воде с естественным содержанием дейтерия, а другая на ОДВ.

2.3 Методика определения соотношения D/H в жидких средах и тканях организма

Определение соотношения D/H в сыворотке крови крыс проводили на ЯМР Фурье – спектрометре 400 МГц (FT NMR SYSTEM модели JNM-ECA 400), с датчиком 40TH5AT/FG2, который имел следующие характеристики: индукция постоянного магнитного поля - 9.389766 Тл; диапазон частот — от 10 до 400 МГц с шагом 0.01 Гц; резонансная частота ядер ^2H - 61.37 Гц (настраивается прибором); дрейф постоянного магнитного поля: менее 4 Гц/ч; ширина ^1H ЯМР сигнала на полувысоте: не более 0.45 Гц (для 0.1 % раствора этилбензола в дейтерохлороформе) по следующей методике [Dzhimak S.S. et al,2015]. Для исследуемого образца использовали откалиброванную основную

ЯМР - ампулу диаметром 4.97 ± 0.013 мм и длиной 178 мм. В неё помещали исследуемое на изотопный состав вещество. Также имелась откалиброванная внутренняя ЯМР-ампула (коаксиальный внешний стандарт) с длиной концевой капилляра 32 мм и его ёмкостью 40 мкл, которая являлась вставкой в основную ЯМР ампулу и содержала в себе вещество – эталон с такой же, как у определяемого вещества молекулярной структурой, но известным изотопным составом. Внутренняя ЯМР - ампула содержала растворённый лантаноидный сдвигающий реагент (трифторметансульфонат европия (III), Sigma, безводный и водорастворимый) благодаря которому сигнал ЯМР вещества внутренней ампулы был смещён относительно определяемого вещества из основной ампулы, что позволяло произвести интегрирование отдельных сигналов спектра друг относительно друга.

В ЯМР спектрах на ядрах дейтерия наблюдается два разнесённых по шкале химических сдвигов ЯМР сигналов от дейтерия воды с растворённым в ней трифторметансульфонатом европия (III), которая находится во внутренней вставке в ампулу и от дейтерия исследуемой воды, находящейся в самой ампуле.

Сыворотку получали из крови крыс, взятой из шейной артерии путем декапитации головного мозга. Кровь собирали в пластиковые пробирки и помещали в термостат при температуре 37°C на 60 минут, затем центрифугировали 15 минут при 2000 об/мин.

Для изучения изотопного состава тканей головного мозга крыс его предварительно высушивали сублимацией в лиофильной сушилке ЛС-1000. Определение соотношения D/H в лиофилизированных тканях головного мозга проводили на масс-спектрометре DELTA^{plus} (Finnigan, Германия), снабженного устройством для подготовки проб к изотопному анализу водорода H/Device (Finnigan, Германия). Твердые образцы заворачивали в металлическую фольгу и помещали в камеру сгорания с помощью автоматического пробоотборника Carlo Erba AS 200 - LS. Изменение изотопного состава выражали в промилле (‰; часть на тысячу) с использованием стандартного дельта - обозначения δ :

$$\delta = (R_{\text{пробы}}/R_{\text{станд}} - 1) \times 1000 (\text{‰}),$$

где R – соотношение изотопов,

$R_{\text{пробы}}$ и $R_{\text{станд}}$ – соотношение D/H в исследуемой пробе и стандарте. Калибровку измерений в твердых образцах выполняли относительно международного образца (IAEA-CH-7, $\delta D = -100.3\text{‰}$) и различных внутренних проверенных стандартов. Точность измерений составляла $\sim \pm 2\text{‰}$ для твердого вещества [Baryshev M. G. et al, 2012].

2.4 Биохимический анализ

2.4.1 Используемые реактивы

Для приготовления супернатанта использовался калиевый - фосфатный буфер $\text{pH} = 7,5$. Состав буфера: 2,72 г K_2HPO_4 ; 7,82 г KCl ; на 1 литр дистиллированной воды. Величина pH полученного раствора доводилась титрованием насыщенным раствором KOH .

В методике определения МДА использовались следующие реактивы: 0,8 % раствор ТБК (Sigma); 2% раствор ортофосфорной кислоты $\text{pH} = 1,3$; 2 % спиртовой раствор бутилированного гидрокситолуола (Sigma).

Для определения активности каталазы использовали раствор пероксида водорода (4 ммоль/л). Перекись водорода титровали стандартным 0,1 н. раствором перманганата калия в кислой среде. Раствор перманганата калия готовился из стандарта титра. Серная кислота готовилась разбавлением концентрированной серной кислоты в соотношении 1:5 по весу. Также в реакции использовался 4 % молибдат аммония (Sigma).

Для исследования активности СОД использовали следующие реагенты: K^+/Na^+ - фосфатный буфер $\text{pH} = 7,5$, который получают смешением гидрофосфата натрия 12 водного и дигидрофосфата калия в соотношении 4: 1, pH доводится на pH -метре, добавляя нужную соль; 1 мМ раствор НАДН восстановленного (Диа – М). Для приготовления инкубационной смеси

используют 65 ммоль раствор феназинметасульфата (Sigma); 4 ммоль раствор нитротетразолиевого синего (Sigma); 27 мкмоль раствор ЭДТА (Диа – М).

Концентрацию GSH определяли с использованием раствора сульфосалициловой кислоты (2% и 5%), раствор реактива Элмана (0,4 % в метаноле) фирмы Sigma.

Активность ГП определяли с помощью следующих реактивов:

Реактив 1. Трис-НСl буфер, 0,1 М, рН=8,5.

Реактив 2. Трис-НСl буфер (0,1 М, рН=8,5), содержащий 6 мМ ЭДТА и 12 мМ азида натрия.

Реактив 3. Гидроперекись третичного бутила (Диа - М), 20 мМ раствор.

Реактив 4. Трихлоруксусная кислота, 20% раствор.

Реактив Элмана (Sigma). 0,01 М раствор ДТНБ на метаноле. (0,4% в метаноле)

Для определения скорости убывания НАДФН, катализируемой ГР, были приготовлены следующие растворы:

1. Раствор 1:

- 150 мл 0,1 М раствора калия хлорида

- 50 мл 0,2 М фосфатного буфера, рН = 7,4.

- 25 мл 0,08 М раствора ЭДТА-4Na

2. 1 % раствор натрия гидрокарбоната.

3. Раствор глутатиона окисленного (Диа-М) $8 \cdot 10^{-3}$ М в 0,01 М растворе натрия

4. Раствор НАДФН (Диа-М) $2 \cdot 10^{-3}$ М в 1% растворе натрия гидрокарбоната

Белок определяли с помощью реактива Фолина (Sigma). При этом использовали вспомогательные реактивы. Реактив А представляет собой 2% раствор карбоната натрия в 0,1 н растворе натрия гидроксида. Реактив В – это 0,5% раствор сульфата меди в 1% растворе цитрата натрия.

2.4.2 Приготовление супернатанта тканей головного мозга

Супернатант получали из навески ткани головного мозга растертой в ступке, охлажденной жидким азотом и помещенной в холодный фосфатный буфер pH=7,4 в расчете 100 мг ткани на 1 мл. Гомогенизировали встряхиванием 15 минут, затем центрифугировали 10 минут при 6000 об/мин. Приготовленный супернатант использовался для определения уровня СРО, концентрации МДА, активности ферментов антиоксидантной защиты (каталаза и СОД).

2.4.3 Определение интенсивности хемилюминесценции

Изучение СРО в тканях головного мозга проводили методом хемилюминесцентного анализа с помощью аппаратно-программного комплекса "Хемилюминометр Lum-5773" и специализированного программного обеспечения "PowerGraph 3.x Professional" с определением интегрального показателя – светосуммы. Интенсивность свечения прямо пропорциональна количеству свободных радикалов в тканях мозга. Методика заключалась в следующем. 200 мкл полученного супернатанта добавлялось в 2,8 мл теплого фосфатного буфера, нагретого до температуры 37 градусов Цельсия. Инициация свечения (окисления) производилась добавлением 30 мкл раствора сернокислого железа [Фархутдинов Р.Р.,1995].

2.4.4 Определение уровня малонового диальдегида

Определение концентрации МДА проводили по методике [Гаврилов В.Б. и др.,1987]. Инкубация всей пробы проводилась в кислой среде при pH=1,3. При этом часть продуктов ПОЛ, относящихся к классу эндоперекисей, разлагалась с образованием малонового диальдегида. Одна молекула МДА связывается с 2 молекулами ТБК с образованием окрашенного комплекса,

имеющего максимум поглощения при 535 нм. Чтобы исключить вклад неспецифического поглощения веществ не липидной природы, измеряли оптическую плотность при 580 нм и расчёт концентрации ведут по разности:

$$\Delta A = A_{535} - A_{580}$$

Ход определения: в реакционную смесь, содержащую 3 мл ортофосфорной кислоты и 1 мл тиобарбитуровой кислоты, вносили 0,2 мл супернатанта и инкубировали на кипящей водяной бане в течение 45 минут. Затем охлаждали в холодной воде до комнатной температуры, чтобы прекратить реакцию. Окрашенные продукты экстрагировали бутанолом в течение 1 минуты. Через 5 минут отбирали верхнюю бутанольную фракцию и центрифугировали при 3000 об/мин 10 минут. Оптическую плотность образцов измеряли на спектрофотометре СФ-103 при 535 и 580 нм против бутанола. Концентрацию МДА рассчитывали по формуле:

$$C_{\text{MDA}} = (0,81 + 106 \Delta A) / C_{\text{белка}}$$

где:

C_{MDA} – концентрация продуктов ПОЛ в пересчёте на МДА (нмоль/1 мг белка);

$\Delta A_{535-580}$ – разность измеренных оптических плотностей проб при 535 и 580 нм;

$C_{\text{белка}}$ – концентрация белка (мг/мл).

2.4.5 Определение активности каталазы

Активность каталазы определяли спектрофотометрически по выходу продукта реакции как указано в методике Королюка [Королюк М.А. и др., 1988].

Каталаза разлагает перекись водорода по реакции: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Об активности каталазы судили по скорости убывания перекиси водорода в среде инкубации. Перекись водорода способна образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при 410 нм.

Ход определения: Инкубацию проб с перекисью водорода проводили 10 мин. при 25⁰С в термостате.

Холостая проба: 2 мл перекиси водорода 7 ммоль/л + 0,1 мл фосфатного буфера рН=7,5.

Опытная проба: 2 мл перекиси водорода 7 ммоль/л + 0,1 мл супернатанта.

Контроль: 2 мл воды + 0,1 мл фосфатного буфера 0,05 моля рН=7,5.

Холостая проба, контроль и опытные пробирки инкубировались вместе 10 мин.

После инкубации во все пробирки добавляли по 1 мл молибдата аммония 4%.

Через 3 минуты измеряли экстинкции холостой и опытных проб против контроля на спектрофотометре при 410 нм.

Расчёт активности каталазы проводили по формуле:

$$A = \frac{(E_{\text{хол}} - E_{\text{оп}}) \times V}{t \times \varepsilon \times C_{\text{белка}}},$$

где:

A – активность каталазы, выраженной мкат/г

E_{хол.} и E_{оп.} – экстинкции холостой и опытной проб;

V – объём вносимой пробы;

t – время инкубации;

ε – коэффициент миллимолярной экстинкции перекиси водорода 22,2 × 10³ л×ммоль⁻¹×см⁻¹

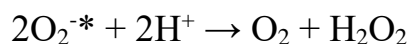
C_{белка} – концентрация белка в пробе, мг/мл.

Концентрацию белка определяли методом Лоури.

2.4.6 Определение активности супероксиддисмутазы

Сущность метода: СОД катализирует дисмутацию супероксидного анион-радикала. Метод основан на способности фермента конкурировать с нитротетразолиевым синим (НТЗС) за супероксидные радикалы, образовавшиеся в результате аэробного взаимодействия НАДН

восстановленного и источника радикалов феназинметасульфата (ФМС) [Дубинина Е. Е. и др., 1988].



В результате реакции НТЗС (детектор радикалов) восстанавливается с образованием гидразинтетразолия и регистрируется при 540 нм. В присутствии СОД процент восстановления НТЗС уменьшается, т.к. СОД гасит радикалы быстрее, скорость реакции $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{сек}^{-1}$. По этой методике определяют цитозольную (Cu/Zn) СОД.

Супернатант, полученный по выше указанной схеме, подвергли действию смеси хлороформ – этанол для осаждения гемоглобина. Далее для отделения гемоглобина смесь центрифугировали 15 мин. при 10^4 об /мин. Полученный супернатант использовали для определения в нем концентрации белка и активности СОД.

Ход определения: К 2,80 мл инкубационной смеси прибавляли 0,1 мл супернатанта, запуская реакцию добавлением 0,1 мл НАДН восстановленного, засекали время по секундомеру. Инкубация длилась 10 мин. при 25°C в темноте. Одновременно запускались 3 пробирки: контроль реактивов и 2 опытные. Через 1,5 мин. в следующую партию пробирок вносили супернатант, через 2 мин. 30 сек. добавляли НАДН, перемешивали встряхиванием и ровно через 3 мин. помещали в баню (25°C , темнота). Инкубация прекращалась освещением и охлаждением пробирок в ледяной бане (0,5 мин), через 1 мин. измеряли экстинкции опытных и контрольной проб на спектрофотометре при 540 нм против контроля. Процедуру повторяли для следующей партии пробирок с интервалом 3 мин.

Опытная проба:

- 0,1 мл супернатанта;
- 0,1 мл НАДН восстановленного (1 ммоль/л);
- 2,80 мл инкубационной смеси.

Контроль реактивов:

- 0,1 мл фосфатного буфера;

- 0,1 мл НАДН восстановленного (1 ммоль/л);
- 2,80 мл инкубационной смеси.

Контроль

- 0,2 мл фосфатного буфера,
- 2,80 мл инкубационной смеси

Активность СОД в ткани рассчитывали на мг белка по следующей формуле

$$A_{\text{СОД}} = \frac{\%T \times 10}{(100 - \%T) \times C_{\text{белка}}}$$

где:

A – активность СОД, выраженная усл. ед./г

T% - % торможения реакции восстановления НТЗС в опытной пробе:

$$T\% = \frac{(E_{\text{кр}} - E_{\text{оп}}) \times 100\%}{E_{\text{кр}}}, \text{ где:}$$

$E_{\text{кр}}$ – оптическая плотность контроля реактивов;

$E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность пробы;

$\frac{\%T}{100 - \%T}$ - коэффициент, учитывающий зависимость между %T и активностью СОД

10 – коэффициент, учитывающий объём взятой для анализа пробы, концентрация белка выражена в мг/мл, а объём пробы – 0,1 мл. Коэффициент = 1: 0,1 = 10

$C_{\text{белка}}$ – концентрация белка, мг/мл;

2.4.7 Определение содержания восстановленного глутатиона

Свободные сульфгидрильные группы – это сульфгидрильные группы пептидов и аминокислот. Преимущественно (около 96%) - это сульфгидрильные группы восстановленного глутатиона, что позволяет говорить о свободных сульфгидрильных группах, как о восстановленном глутатионе (GSH).

Определение GSH производилось реактивом Элмана (5 5'- дитиобис (2-нитробензойная кислота – ДНТБ) в супернатанте после осаждения белков, как описано в методике [Sedlak J.,1968].

После прибавления ДНТБ пробы окрашивались в жёлтый цвет (образуется нитротиобензоат (НТБ) в эквимольном с восстановленным глутатионом количестве). Оптическая плотность регистрировалась спектрофотометрически при 412 нм.

75 мг ткани, помещали в 1 мл ледяного 5 % раствора сульфосалициловой кислоты. Осаждение белков проводили в ледяной воде, при перемешивании стеклянной палочкой в течение 5 мин. Центрифугировали 10 мин при 7000 об/мин. Супернатант разбавляли в 2,5 раз водой для снижения концентрации сульфосалициловой кислоты до 2 %; концентрация ткани в супернатанте – 30 мг/мл.

Ход определения: Измеряли оптическую плотность пробы при 412 нм против контроля через 5 мин после добавления рабочего раствора ДНТБ

Проба:

- 0,2 мл супернатанта
- 2,25 мл трис- HCl буфера 0,4 М; pH=8,9
- 0,05 мл рабочего раствора ДНТБ

Контроль:

- 0,2 мл 2 % раствора сульфосалициловой кислоты.
- 2,25 мл трис- HCl буфера 0,4 М; pH=8,9
- 0,05 мл рабочего раствора ДНТБ

Содержание восстановленного глутатиона вычисляли по линейному уравнению регрессии, рассчитанному методом наименьших квадратов по нескольким стандартным растворам (калибраторам) GSH в 2 % сульфосалициловой кислоте.

$$E = a \times [GSH] + b,$$

где:

E – оптическая плотность;

[GSH] – концентрация восстановленного глутатиона, мкмоль/л;

a – коэффициент наклона;

b – коэффициент сдвига.

В результате окончательное уравнение после расчета градировочных коэффициентов и пересчёта концентрации, восстановленного глутатиона в мкмоль/1 г вл. ткани, имело вид:

$$[\text{GSH}] = \frac{E - 0,00225}{0,0369}$$

2.4.8 Определение активности глутатионпероксидазы

Во время инкубации пробы ГП из супернатанта окисляет насыщающие концентрации глутатиона восстановленного – субстрата. По количеству оставшегося не окислённым GSH судят об активности ГП. Каталаза устраняется из пробы азидом натрия во время преинкубации. Концентрацию глутатиона восстановленного определяют спектрофотометрически при 412 нм с помощью реактива Элмана [Моин В.М., 1986].

Ход определения: Первый этап заключался в преинкубации пробы.

Каждая проба выполнялась в 3 параллельных пробирках. 0,1 мл супернатанта проинкубировали с 0,83 мл реактива 2 в течение 10 мин в водяной бане при 37°C. Пробы запускались с интервалом 15 сек. Далее следовала инкубация пробы. Она запускалась добавлением 70 мкл реактива 3 и продолжалась точно 5 мин при 37° С. Интервал между добавлением реактива 3 в пробирки – 15 сек. Остановка инкубации производилась осаждением белков: добавлением 0,2 мл холодного реактива 4 (20 % раствора ТХУ) также с интервалом 15 сек. Осаждение белков производилось на холоде в течение 5 мин. Заключительным этапом являлась контрольная проба. Она выполнялась также в 3 пробирках аналогично опытной. Отличалась тем, что супернатант вносили после инкубации, одновременно с добавлением реактива 4.

После осаждения белков пробы центрифугировали при 1500 об/мин. в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отбирали в пробирки и тщательно встряхивали. Затем в надосадочную жидкость вносили реактив 1 и добавляли реактив Элмана. Содержимое пробирки хорошо встряхивали. Точно через 5 мин измеряли экстинкцию опытных и контрольных проб при 412 нм против реактива 1.

Расчет активности ГП производили с учетом разведения биологического материала и коэффициента молярной экстинкции ТНФА, образующегося в реакции глутатиона восстановленного с реактивом Элмана. Расчет велся на 1 г белка.

$$A_{\text{ГП}} = \frac{10^6 \times \Delta E}{\epsilon \times l \times t \times C_6}$$

где:

$A_{\text{ГП}}$ – активность ГП в мкмоль GSH/1 мин. 1 г белка

10^6 – коэффициент, учитывающий перевод моль в мкмоль;

$\Delta E = E_{\text{КР}} - E_{\text{ОП}}$ – разность экстинкций контрольной и опытной проб;

ϵ – коэффициент молярной экстинкции ТНФА при 412 нм, $\epsilon = 11400 \text{ л моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

l – толщина кюветы в см, $l = 1 \text{ см}$;

t – время инкубации в мин., $t = 5 \text{ мин.}$;

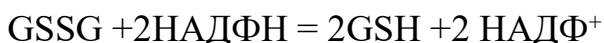
C_6 – концентрация белка в пробе, г/л

С учётом разведения биологического материала окончательная формула приобретает вид:

$$A_{\text{ГП}} = \frac{21470 \times \Delta E}{C_6}$$

2.4.9 Определение активности глутатионредуктазы

Мерой активности ГР является скорость окисления НАДФН, регистрируемая по уменьшению поглощения восстановленной формы НАДФН при 340 нм [Юсупова Л.Б., 1989]:



Измеряется падение экстинкции в опытных пробах, вызванное падением концентрации НАДФН в реакции с окисленным глутатионом, катализируемой ГР во время инкубации при 37°C.

Ход определения: На одну пробу готовили 2 пробирки.

1 пробирка – 2,25 мл раствора 1 + 0,05 мл супернатанта + 0,1 мл раствора окисленного глутатиона (GSSG) в 0,01н растворе натрия гидроксида.

2 пробирка – 2,25 мл раствора 1 + 0,05 мл супернатанта + 0,1мл 0,01н раствора натрия гидроксида.

Реакция запускалась добавлением 0,1 мл раствора НАДФН в 1% растворе натрия гидрокарбоната. Для запуска брали 1 пробу (2 пробирки). После запуска через 1 минуту измеряли экстинкцию на спектрофотометре при 340 нм против воды. Сначала запускали пробу с окисленным глутатионом, затем – с натрия гидроксидом, в таком же порядке измеряли экстинкцию.

После измерения содержимое пробирок ставили на водяную баню (37°C) на 10 мин.

После этого пробирки помещались в холодную воду примерно на 1 мин (для прекращения реакции), затем через 1 мин производили измерение экстинкции при 340 нм против воды. Расчет активности ГР осуществляли по формуле:

$$A_{\text{ГР}} = \frac{10^6 \times (\Delta E_1 - \Delta E_2)}{\varepsilon \times l \times t \times C_G},$$

где:

$A_{\text{ГР}}$ – активность НАДФН в мкмоль GSH/1 мин. 1 г белка

10^6 – коэффициент, учитывающий перевод моль в мкмоль;

ΔE_1 – изменение экстинкции в 1 пробирке (с глутатионом окисленным);

ΔE_2 – изменение экстинкции во 2 пробирке (без глутатиона окисленного);

ε – коэффициент молярной экстинкции НАДФН при 340 нм, $\varepsilon = 6220 \text{ л моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

l - толщина кюветы в см, l=1 см;

t - время инкубации в мин., t= 5 мин.;

C_{б.} – концентрация белка в пробе, г/л

С учётом разведения биологического материала окончательная формула приобретает вид:

$$A_{ГР} = \frac{13,4 \times (\Delta E_1 - \Delta E_2)}{C_б}$$

2.4.10 Метод Лоури

Содержание белка в пробе определяют с использованием коэффициента, рассчитанного по графику, построенному по калибровочному раствору человеческого сывороточного альбумина по следующей методике [Филиппович Ю.Б.,1982].

Ход определения: Супернатант перед определением разбавляют в 2 раза фосфатным буфером 1/15 моля, рН = 7,4 для того, чтобы экстинкция пробы соответствовала линейному участку градуировочного графика. К 0,2 мл супернатанта прибавляют 0,2 мл фосфатного буфера. Определение белка производится в двух-трёх параллельных пробах, рассчитывается среднее значение.

Проба: - 0,1 мл супернатанта;

- 0,9 мл фосфатного буфера 1/15 моля, рН = 7,4;

- 4 мл реактива А + В

Через 10 мин. прибавляют 0,4 мл реактива Фолина.

Контроль: -1 мл фосфатного буфера 1/15 моля, рН = 7,4;

- 4 мл реактива А + В

Через 10 мин. прибавляют 0,4 мл реактива Фолина.

Пробы инкубируют 30 минут (время фиксированное) при 37⁰ С в темноте (т.к. реактив Фолина фоточувствителен), измеряют экстинкции проб при 750 нм против контроля.

Расчет концентрации белка осуществляли по формуле:

$C_{\text{белка}}(\text{мг/мл}) = 20 \times E/K$, где:

E – измеренная экстинкция пробы;

K – коэффициент, рассчитанный методом наименьших квадратов.

20 – разбавление супернатанта фосфатным буфером, перед определением в 2 раза, затем в 10 раз (0,1 мл супернатанта + 0,9 мл фосфатного буфера).

$C (\text{мг/мл или г/л}) = 20 \times E/4 = 5 \times E$;

2.5 Поведенческие тесты

2.5.1 Приподнятый крестообразный лабиринт

Функциональное состояние ЦНС животных исследовали в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» и «Т-образный лабиринт» [Буреш Я. и др, 1991].

В тесте ПКЛ оценивали состояние тревожности экспериментальных животных. Приподнятый крестообразный лабиринт с рукавами длиной 90 см, имел два открытых и два закрытых рукава, высота стенок 15 см. Учитывали число заходов в закрытые рукава лабиринта, число стоек и свешиваний, число заходов в открытые рукава лабиринта и число подходов к дистальному концу открытых рукавов, а также время пребывания в открытых, закрытых рукавах и центре лабиринта. Все показатели в этих тестах регистрировали в течение 5 мин наблюдения.

2.5.2 Т-образный лабиринт

Выработку условного рефлекса с положительным подкреплением оценивали в тесте «Т-образный лабиринт». После приучения животных к лабиринту вырабатывали навык чередования право- и левосторонних побежек на положительном подкреплении. Для повышения мотивации обучение проводили на фоне пищевой депривации. Крыс, подвергавшихся 48-часовой

пищевой депривации, помещали в стартовый отсек «Т-образного лабиринта», в одном из рукавов которого располагалась кормушка с пищей. Через 30 с после посадки крыс открывали дверцу стартового отсека. Щелчок открывания дверцы служил условным раздражителем. Учитывали следующие показатели: процент правильных побегов, время выполнения условно-рефлекторной реакции. В течение 4 суток обучения для выработки навыка двустороннего чередования право- и левосторонних побегов каждое животное совершало по 20 побегов. Затем через 2 суток проверялось сохранение памятного следа. Данные побегов усреднялись за каждый день.

2.6 Электрофизиологические исследования

Электрофизиологические исследования проводили по следующей методике [Kondratenko R.V. et al,2003]. Для определения активности гиппокампальных нейронов животных декапитировали, готовили 3 – 4 поперечных среза гиппокампа и помещали в камеру с подогретым до 28 °С инкубационным солевым раствором. В работе были использованы два ИСР, приготовленных на воде с различным содержанием дейтерия. ИСР1 был приготовлен на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm). ИСР2 был приготовлен на обедненной дейтерием воде (ОДВ) с концентрацией 50 ppm. Оба ИСР насыщались карбогеном (95 % O₂ + 5 % CO₂) и имели следующий состав (мМ): NaCl – 124; KCl – 3; CaCl₂ – 2.5; MgSO₄ – 2.5; Na₂HPO₄; NaHCO₃ – 26; D – глюкоза – 10 и pH=7.25. Скорость протока составляла 2.5 – 3 мл/мин. Регистрацию электрической активности начинали через 2 часа после приготовления срезов. Вызванный потенциал (поп - спайк) в пирамидном слое CA1 регистрировали с помощью стеклянного микроэлектрода, заполненного 1.5 М NaCl. Стимуляцию осуществляли прямоугольными импульсами с частотой 0.1 Гц через биполярные стеклянные электроды, заполненные перфузирующей средой и помещенные в радиальный слой поля CA1. Интенсивность стимула подбирали так, чтобы амплитуда пикового компонента

ответа составляла 50 % от максимальной величины. Действие среды с различным содержанием дейтерия изучали путем переключения системы протока с резервуара, содержащего ИСР1 на резервуар с ИСР2. По истечении 10 минут производили обратное переключение на резервуар с ИСР1. Активность популяции пирамидных клеток оценивали по изменению амплитуды поп – спайка (ПС).

2.7 Исследование культуры нервной ткани

2.7.1 Культивирование клеток зерен – мозжечка

Культуры клеток-зерен мозжечка получали от 7–9-дневных крыс методом ферментно-механической диссоциации [Викторов И.В.,1988]. Под эфирным наркозом извлекали мозжечок, промывали в стандартном фосфатном буфере (PBS), не содержащем Mg^{2+} и Ca^{2+} , измельчали и обрабатывали трипсином при $35^{\circ}C$ в течение 20 минут в PBS, содержащем 0,25% трипсина и 0,04% ЭДТА. После этого ткань промывали в трех сменах PBS и один раз в питательной среде, содержащей 90% минимальной среды Игла, 9,2% эмбриональной телячьей сыворотки, 0,8% глюкозы, 2 ммоль/дм³ глутамина, 0,5 МЕ/мл инсулина, 10 ммоль/дм³ HEPES, 22 ммоль/дм³ NaHCO₃. Далее ткань подвергали в питательной среде механической диссоциации с помощью пастеровских пипеток, суспензию клеток центрифугировали 1,5 минуты при 1500 об/мин, удаляли супернатант, а осадок ресуспендировали в свежей среде. Полученную суспензию наносили в 96-ти луночные стерильные планшеты. Культуры использовали в эксперименте спустя 7-8 дней *in vitro*.

2.7.2 Методика экспериментов на культуре тканей

Для исследования влияния среды с пониженным содержанием дейтерия на функциональные показатели и уровень гибели нейронов мозжечка

использовали два ИСР. Один из них был приготовлен на воде с природным содержанием дейтерия (150ppm). Другой был приготовлен на ОДВ с концентрацией дейтерия 50 ppm. Оба раствора имели одинаковый состав: NaCl 154 mM, KCl 25 mM, CaCl₂ 2.3 mM, MgCl₂ 1 mM, NaHCO₃ 3.6 mM, Na₂HPO₄ 0.35 mM, HEPES 10 mM, glucose 5.6 mM. Измерение МПМ, уровня свободных радикалов и выживаемость нейронов мозжечка производили на многофункциональном ридере для микропланшетов Filter Max F5

2.7.2.1 Внутриклеточное определение уровня активных форм кислорода, [Ca²⁺] и измерение мембранного потенциала митохондрий нейронов мозжечка

Для определения уровня АФК, [Ca²⁺] и МПМ культуры были разделены на группы по содержанию дейтерия в инкубационном солевом растворе (150 и 50 ppm). Для обнаружения АФК в культуры добавляли дегидрородамин 123, для определения уровня МПМ – тетраметилродамин. Оносительный уровень ионов кальция определяли с помощью Fluo-4. Время загрузки зондов составляло 30 мин при 36 °С. Затем культуры отмывали и измеряли интенсивность флуоресценции: для дегидрородамина 123 при длине волны возбуждения 485 нм, и длине волны испускания 535 нм; для тетраметилродамина при длине волны возбуждения 535 нм, и длине волны испускания 595 нм; для Fluo-4 при длине возбуждения 495 нм, и длине испускания 516 нм [Исаев Н.К. и др.,2008; Генрихс Е.Е. и др.,2017].

Результаты измерения представляли в %, за 100% принимали интенсивность флуоресценции контрольных культур - 150 ppm, без сукцината.

2.7.2.2 Определение уровня гибели нейронов при глюкозной депривации

Культуры были разделены на группы: 150 и 50 ppm без депривации, 150 и 50 ppm + ГД. Депривацию глюкозы проводили в течение 1 часа в

инкубационной среде того же состава, но без глюкозы. Затем культуры возвращали в исходный солевой раствор с глюкозой и помещали в CO₂-инкубатор. Через 24 часа в культуры был добавлен йодид пропидия (PI) в концентрации 5 мкг/мл на 15 мин [Стельмашук Е.В. и др.,2010]. Интенсивность флуоресценции измеряли после отмывки культур при длине волны возбуждения 535 нм, эмиссии 625 нм. Результаты измерения представляли в процентах, за 100% принимали интенсивность флуоресценции контрольных культур - 150 ppm.

2.7.2.3 Определение уровня гибели нейронов при температурном стрессе

Культуры были разделены на группы по содержанию дейтерия в инкубационном солевом растворе (150 и 50 ppm) и по содержанию сукцината (мкМ): 0, 25, 50, 100 и 200. Температурный стресс моделировали, помещая культуры в термостат на 24 часа при различных температурах 22, 26, 36 и 39 градусах Цельсия. Выживаемость оценивали по той же методике, что и при ГД с добавлением PI.

2.8 Изучение активности пероксидазы хрена в модельных системах

Для определения активности ПХ в средах с различным содержанием дейтерия (150 и 50 ppm) использовали две модельные системы. Первая представляет собой реакцию пероксидазного окисления о – дианизидина (Sigma) перекисью водорода [Лебедева О. В. и др.,1977]. Вторая модельная система представляет пероксидазное окисление люминола пероксидом водорода, сопровождающееся хемилюминесценцией [Измайлов Д.Ю. и др.,2017].

2.8.1 Приготовление реактивов

Для этих модельных систем были приготовлены следующие растворы. Стоковый (основной) раствор ПХ (Sigma) готовили в 0.01 М калий - фосфатном буфере при pH=7,5, приготовленном на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm). За 2 часа до измерений готовили два рабочих раствора ПХ и термостатировали при 37 ° С. Первый рабочий раствор готовили разведением основного раствора фосфатным буфером (pH=7,5), приготовленного на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm). Второй рабочий раствор готовили разведением основного раствора фосфатным буфером, приготовленного на воде с пониженным содержанием дейтерия (40 ppm). Концентрацию ПХ в рабочих растворах определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 403 нм и $\epsilon_{403} = 10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [Рогожин В.В. и др., 2000], она составила 7,5 нг/мл. Растворы перекиси готовили разбавлением исходного 38 % раствора водой. Концентрацию пероксида водорода определяли титрованием перманганатом калия. Раствор о – дианизида (Sigma) готовили в этаноле по навеске (0,25 мг/мл). Люминол (Sigma) растворяли в диметилсульфоксиде (Sigma) также по навеске (7 мг /мл). Из этого раствора готовили рабочий раствор люминола путем 100 кратного разведения фосфатным буфером (150 ppm).

2.8.2 Модельная система пероксидазы хрена - H_2O_2 - дианизидин

Эксперимент состоял в следующем: в шести луночные планшеты (диаметр лунки 3.5 см) последовательно приливали 2 мл рабочего буферного раствора ПХ, 0,1 мл спиртового раствора о - дианизида. Реакцию инициировали добавлением пероксида водорода нужной концентрации в объеме 0,1 мл. Кинетику реакции изучали спектрофотометрически, измеряя начальную скорость окисления о – дианизида (V_0) при длине волны 460 нм $\epsilon_{460} = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ для конечного продукта при температуре 37°C [Рогожин

В.В.,1999]. Длина оптического пути рассчитывалась отношением объема реакционной смеси к площади основания цилиндрической лунки. Окислением о – дианизидина кислородом воздуха и пероксидом водорода в отсутствие фермента пренебрегали, т.к. оно не превышало 1 % от скорости ферментативной реакции. Измерения проводили на многофункциональном ридере для микропланшетов Filter Max F5 (США). По результатам измерений строили график зависимости начальной скорости пероксидазной реакции окисления от начальной концентрации пероксида водорода при постоянной концентрации о - дианизидина. Линеаризацию зависимости начальной скорости пероксидазной реакции окисления от начальной концентрации пероксида водорода осуществляли в координатах Лайнуивера - Берка и Иди - Хофсти. По данным графикам определяли максимальную скорость реакции и константу Михаэлиса.

2.8.3 Модельная система пероксидазы хрена - H_2O_2 - люминол

Эксперимент со второй модельной системой состоял в следующем: к 2 мл рабочего буферного раствора ПХ (150 и 50 ppm) при температуре 37 ° С добавляли 15 мкл люминола. Реакцию инициировали добавлением пероксида водорода (0,25 мМ) в объеме 30 мкл. Свечение, даваемое окислением люминолом кислородом воздуха и пероксидом водорода в отсутствие фермента, было на уровне фонового. За кинетикой реакции следили методом хемилюминесцентного анализа с помощью аппаратно-программного комплекса "Хемилюминометр Lum-5773" и специализированного программного обеспечения "PowerGraph 3.x Professional" с определением интегрального показателя – светосуммы и тангенса угла наклона касательной [Владимиров Ю.А.,2009].

2.9 Оптические исследования структуры пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина

Структуру ПХ и БСА в средах с различным содержанием дейтерия (150 и 50 ppm) изучали с помощью спектров собственной флуоресценции этих белков и спектров кругового дихроизма (КД).

Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, Австралия). Собственную триптофановую флуоресценцию возбуждали светом длиной волны 297 нм [Степаненко О.В.,2005], а совместную триптофановую и тирозиновую флуоресценцию измеряли при возбуждении светом с длиной волны 280 нм [Степаненко О.В.,2005]. Спектры кругового дихроизма регистрировали на дихрографе Jasco J 810 (Япония).

2.9.1 Приготовление реактивов

Стоковые (основной) растворы ПХ (Sigma) и БСА (Sigma) готовили в 0,01 М калий - фосфатном буфере при pH=7,5, приготовленные на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm). За 2 часа до измерений готовили два рабочих раствора ПХ и два рабочих раствора БСА и термостатировали при 37 ° С. Первый рабочий раствор для одного и другого белка готовили разведением основного раствора фосфатным буфером (pH=7,5), приготовленного на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm). Второй рабочий раствор для обоих белков готовили разведением основного раствора фосфатным буфером, приготовленного на воде с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm). Концентрацию ПХ и БСА в рабочих растворах определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярной экстинкции $\epsilon_{403} = 10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [Рогожин В.В.,1999] для ПХ и $\epsilon_{279} = 43824 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ для БСА [Поляничко А. М. и др.,2016]. Для обоих белков она составила 0.1 мг/мл.

2.10 Способ получения обеднённой дейтерием воды

Данный способ получения ОДВ основан на различии окислительно-восстановительных потенциалов и кинетических характеристик процесса восстановления водорода из лёгкой и тяжёлой воды [Petriev I.S.et al,2018]. Электрохимический способ применялся ранее для обратного процесса — получения тяжёлой воды, используемой в ядерной энергетике. Разделение происходит следующим образом. Производится электролиз воды, при котором разложению подвергаются в основном молекулы, содержащие протий, по причине меньшей энергии ковалентной связи. Далее идёт синтез воды из смеси кислорода и водорода, обогащённого протием. Для увеличения коэффициента разделения и уменьшения перенапряжения водорода электроды изготовлены из никеля. Установка позволяет получить продукт с содержанием дейтерия - 50 ppm (миллионных долей).

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Исследование изменения концентрации дейтерия в сыворотке крови и тканях мозга

Из рисунка 1 видно, что у крыс, в рационе которых была ОДВ - группа 2, происходило заметное снижение концентрации дейтерия в крови. При этом наибольшее замещение дейтерия на протий в крови наблюдалось в течение первой недели поения. Так после первого дня поения содержание дейтерия снизилось на 5 %, на второй день уже на 12 % по сравнению с начальным уровнем в момент начала поения. На восьмой день эксперимента концентрация дейтерия в крови уменьшилась на 23 % и составила 113 ppm. По графику видно, что кривая вышла на плато на 10 день и в последующие две недели поения динамика значительно не менялась. При этом концентрация дейтерия в контрольной группе (группа 1) не менялась в течение всего эксперимента.

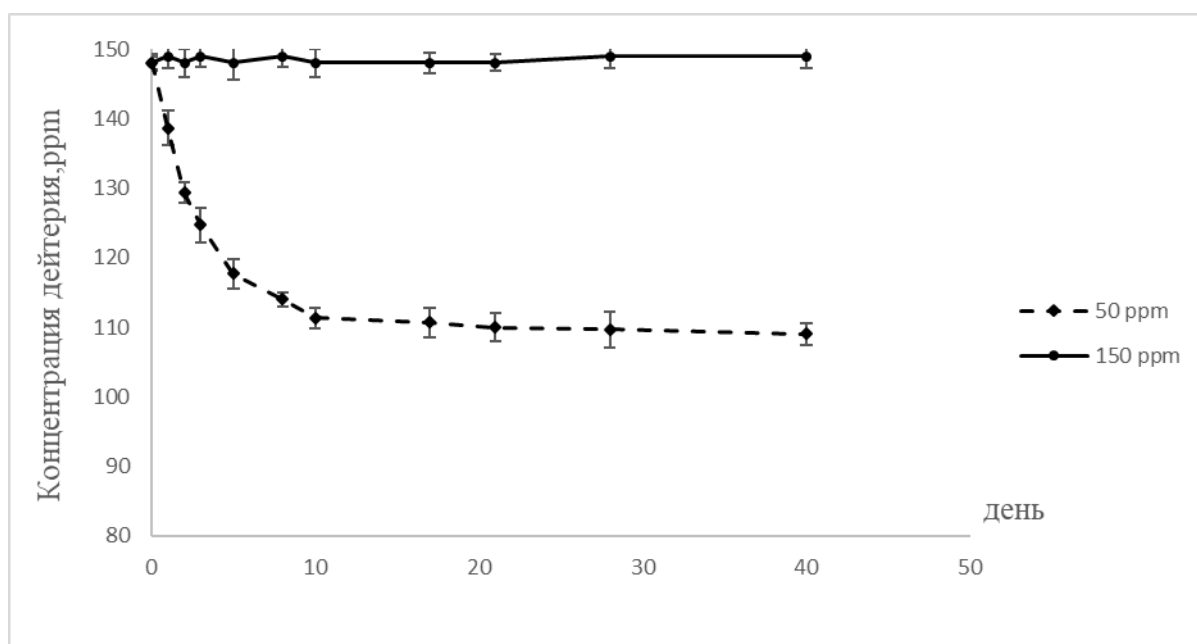


Рисунок 1 – Динамика изменения концентрации дейтерия в сыворотке крови по дням

Концентрация тяжелого водорода в тканях головного мозга на 42 день эксперимента уменьшилась на 19 % и составила 119 ppm (рисунок 2).

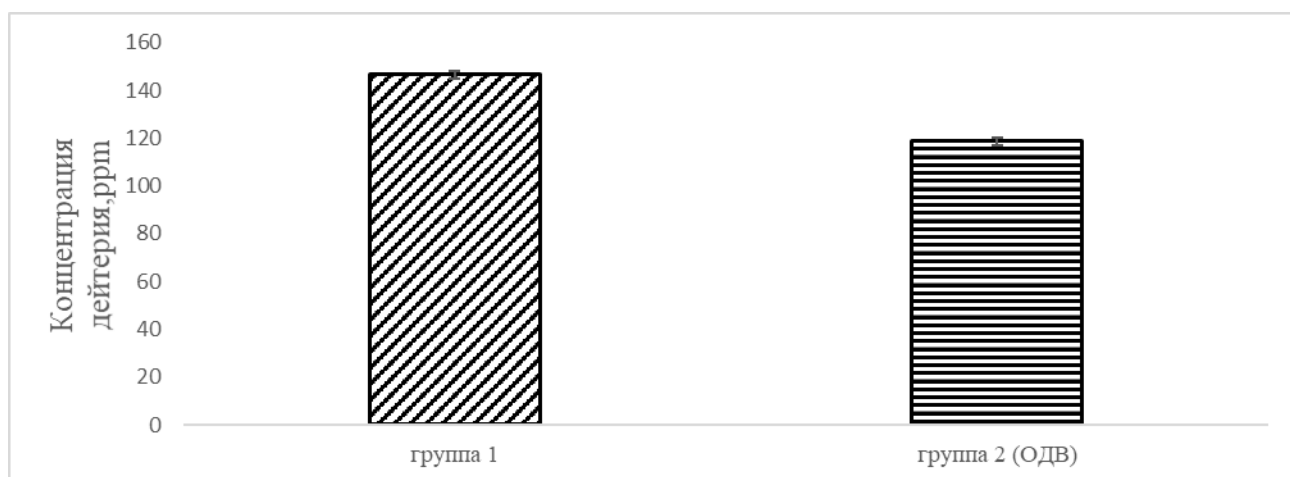


Рисунок 2 – Изменение концентрации дейтерия в тканях головного мозга на 42 день эксперимента

Выход графика на плато может означать насыщение крови и лимфы протием и началом активного замещения дейтерия на протий в тканях и органах в условиях созданного изотопного градиента. Снижение концентрации дейтерия в экстрацеллюлярной жидкости и тканях организма происходит вследствие изотопного D/H обмена в белках, липидах и нуклеиновых кислотах, образующих клетки. Известно, что наиболее активно такое замещение происходит в функциональных группах, имеющих неподелённую электронную пару и способных образовывать водородные связи. К таким атомным группировкам относятся гидроксильные (-OH), карбоксильные (-COOH), аминогруппы (-NH₂). По цепочкам водородных связей по механизму Гротгуса реализуется переход протонов и дейтронов от одной биомолекулы к другой. Также активному замещению дейтерия на протий в организме способствует изотопный обмен, реализующийся между данными группами биомолекул и гидратной оболочкой посредством водородных связей.

3.2 Влияние изотопного обмена D/H на окислительные процессы в тканях головного мозга

Из результатов исследований видно (таблица 2), что у гипоксированных животных в группах 6 (150 ppm+гипоксия - 6 недель) и 7 (50+гипоксия - 6 недель) на 43 сутки и в группах 3 (150 ppm + гипоксия – 2 недели) и 4 (50 ppm + гипоксия – 2 недели) на 15 сутки развивался интенсивный окислительный процесс в тканях головного мозга. Это выражалось повышением концентрации МДА и увеличением интегрального показателя хемилюминесценции по сравнению с интактными группами 1-А (150 ppm - 2 недели) и 1-В (150 ppm - 6 недель). Данный факт хорошо согласуется с литературными данными о том, что при гипоксии происходит гиперпродукция АФК и истощение низкомолекулярной и ферментативной АОС организма, ведущее к необратимым патологическим повреждениям нейронов головного мозга [Поварова О.В. и др.,2003; Шурыгина Л. В. и др.,2017].

Крысы, которые получали ОДВ в течение 2-х недель, имели самые высокие показатели уровня СРО и МДА. Так в группе 4 (50 ppm + гипоксия - 2 недели) интенсивность свечения и уровень МДА были достоверно $p < 0,05$ выше на 23 % и 6 % по сравнению с группой 3 (150 ppm + гипоксия-2 недели). В этой же группе светосумма хемилюминесценции и концентрация МДА была больше на 29 % и 15 % по сравнению с группой 6 (150 ppm + гипоксия - 6 недель) и на 51 % и 72 % в сравнении с группой 7 (50 ppm + гипоксия -6 недель). Животные 2 группы (50-2 недели) не подвергались гипоксическому воздействию, тем не менее, их показатели уровня СРО и МДА были относительно высокими. Между группами 3 (150 ppm + гипоксия - 2 недели) и 6 (150 ppm + гипоксия - 6 недель) не было достоверного отличия. Таким образом, вызванный изотопный D/H обмен в организме крыс, на фоне непродолжительного приема ОДВ, вызывает стрессовую реакцию и в результате животные 4 группы (50 ppm + гипоксия - 2 недели) подверглись не только гипоксическому воздействию, но еще и дополнительной стрессовой реакции за счет снижения дейтерия в крови и

тканях. Данное обстоятельство и привело к более интенсивному образованию свободных радикалов в этой группе.

Таблица 2 - Показатели окислительного стресса в тканях головного мозга крыс

Группа животных	Интегральный показатель СРО под кривой графика ХЛ, у.е.	Концентрация МДА, нмоль/мг
Группа 1А (150-2 недели)	54,8±2,0	2,1±0,1
Группа 1В (150-6 недель)	55,6±2,3	1,9±0,1
Группа 2 (50-2 недели)	81±2,6*	2,8±0,2*
Группа 3 (150+Огипоксия -2 недели)	75,4±3,0*	2,9±0,1*
Группа 4 (50+гипоксия -2 недели)	92,9±2,1*	3,1±0,3*
Группа 5 (50-6 недель)	48,3±2,9	1,9±0,2
Группа 6 (150+гипоксия - 6 недель)	72,2±4,0*	2,7±0,3*
Группа 7 (50+гипоксия -6 недель)	61,4±2,8*#	1,8±0,1#

Примечания: Данные представлены М±m; *- p <0,05 к группе 1; # - p <0,05 к группе 6

Напротив, у животных 7 группы (50 ppm + гипоксия - 6 недель) уровень интенсивности ХЛ был достоверно (p <0,05) на 15% меньше, а уровень МДА был также достоверно (p <0,05) меньше на 33 %, по сравнению с 6 группой (150 ppm + гипоксия - 6 недель). Это свидетельствует о том, что изотопный обмен D/H, на фоне продолжительного приема ОДВ, способствовал снижению интенсивности окислительных процессов в тканях головного мозга на фоне острой гипоксии. Также нет достоверных отличий между группой 5 (50 ppm - 6 недель) и интактной группой.

Таблица 3 – Активность каталазы и СОД в тканях головного мозга

Показатель	Группа 1В- контроль	Группа 5 (50 -6 недель)	Группа 6 (150+ОГ-6 недель)	Группа 7 (50+ОГ-6 недель)
Каталаза	15003±2549	15352±1534	10996±1718*	15581±1292#
СОД	42±11	40±10	55±11	47±9

Примечание: Данные представлены $M \pm m$; * - $p < 0,05$ к группе 1; # - $p < 0,05$ к группе 6

Воздействие острой гипоксии на фоне продолжительного приема ОДВ характеризовалось рядом особенностей функционирования антиоксидантной системы (таблица 3). Это выразилось достоверным снижением активности каталазы в гомогенатах мозга крыс 6 группы на 26,7 %, при отсутствии достоверных изменений в сравнении с контролем в группе 7. В то же время, активность СОД была повышена значительно сильнее в группе 6 по сравнению с группами 1 В и 7 (на 32,9 % и 16,8 % соответственно), что можно охарактеризовать как более сбалансированную работу ферментов первой и второй линии антиокислительной защиты в тканях головного мозга крыс, потреблявших воду, обедненную по дейтерию, чем у животных с обычным питьевым рационом (150 ppm по дейтерию) при развитии изменений в нервной ткани, обусловленных гипоксическим повреждением. Продолжительное потребление ОДВ в отсутствие действия стресса не приводило к заметным нарушениям работы каталазы и СОД.

У животных, подвергшихся гипоксии (группа 6 и 7) наблюдалось повышение активности ГП (на 108,5% и 45,8%) и ГР (на 12,3% и 13,8%) в сравнении с контрольной группой 1, что указывает на значительное напряжение функционирования ферментов тиолового цикла с более оптимальным соотношением активности ГП и ГР у крыс, потреблявших воду с концентрацией дейтерия 50 ppm (таблица 4). У крыс 6 группы существенный дисбаланс в работе ферментов антиокислительной защиты проявлялся наибольшим уменьшением содержания, восстановленного глутатиона по

сравнению с контрольной группой и 7 группой (на 13% и 30%). При этом у животных 5 группы существенных различий в работе глутатионовой системы выявлено не было.

Снижение каталазной активности, на фоне увеличения активности СОД, вызванное гипоксией, свидетельствует о гиперпродукции пероксида водорода в нейронах головного мозга. Данное обстоятельство отягощает развитие окислительного стресса. Увеличение концентрации перекиси водорода в клетках способствует ее взаимодействию с катионами двухвалентного железа и гиперпродукции гидроксильного радикала в результате реакции Фентона. Повышение уровня гидроксильного радикала в клетке способствовало образованию органических пероксидов и активации ГП, действие которой направлено на их дезактивацию. Заметная разбалансировка ферментов АОЗ, вызванная гипоксией, приводит к уменьшению скорости дезактивации АФК, следовательно, к повышенному окислению SH-групп цистеина основная доля которых приходится на свободный глутатион. Таким образом, гипоксия приводит к индукции окислительного стресса, дисфункции работы ферментов АОЗ и уменьшению свободного глутатиона в тканях головного мозга крыс.

Таблица 4 – Показатели глутатионовой системы в тканях головного мозга крыс

Показатель	Группа 1В- контроль	Группа 5 (50 -6 недель)	Группа 6 (150+ОГ-6 недель)	Группа 7 (50+ОГ-6 недель)
ГР	65±13	62±11	73±11	74±10
ГП	59±8	61±10	123±16*	86±12*#
GSH	1,21±0,16	1,22±0,1	1,05±0,05*	1,49±0,07*#

Примечание: Данные представлены M±m; *- p <0,05 к группе 1; # - p <0,05 к группе 6

Наблюдаемый эффект смещения про- и антиоксидантного равновесия на фоне D/H обмена можно объяснить с позиции классического представления о стрессе. Можно предположить, что снижение концентрации дейтерия в организме приводит к нарушению гомеостатического равновесия и развитию

стрессовой реакции. В свое время еще Г. Селье высказывал предположение, что если действие стрессора адекватно и не превышает потенциал стресс-лимитирующих систем, то происходит включение неспецифических механизмов приспособления и усиление компенсаторных функций [Селье, 1979]. В результате этого у организма вырабатывается устойчивость к данному стрессору, а также и стрессорам иной природы. Такое явление в адаптационной медицине называется кондиционирование [Меерсон, 1993]. Например, в результате ишемического прекондиционирования происходит выработка резистентности к острой гипоксии при предварительном действии неоднократных умеренных актов гипоксии или при предварительном введении низких концентраций ЛПС, вызывающих умеренную воспалительную реакцию [Баранова, 2017]. Если действие стрессора чрезмерно, то происходит не обратимое истощение стресс-лимитирующих систем организма, приводящая к его гибели. Мы предполагаем, что вызванный изотопный D/H обмен в организме (как между потребляемой водой и плазмой, так и между плазмой крови и тканями органов) ввязывает умеренный стресс, запускающий комплекс адаптивных реакций. В начале первых двух недель вызванный изотопный D/H обмен в организме приводит к усилению окислительных процессов, а также снижению массы тела животных [Джимак и др., 2015], однако, при более продолжительном воздействии изотопного D/H обмена данные показатели выравниваются до контрольных значений. При этом ни одно животное в эксперименте не погибало, следовательно, снижение концентрации дейтерия в организме можно расценивать как умеренное стрессовое воздействие. В литературе такое явление получило название «изотопного шока» [Basov et al, 2019]. На более поздних стадиях изотопного D/H обмена происходит завершение адаптации к данной стрессовой реакции и активация защитных систем к действию другого стрессора в нашем случае - гипоксии, заключающаяся в мобилизации энергетических и структурных ресурсов, активации факторов транскрипции и как, следствие увеличение синтеза ряда защитных белков и ферментов, изменение активности рецепторов и т.д.

[Ветровой, 2017]. Таким образом, животные 4 группы подверглись не только гипоксическому воздействию, но еще и дополнительному стрессу за счет изотопного D/H обмена, что и привело к повышенному образованию свободных радикалов.

3.3 Влияние изотопного замещения D/H в тканях головного мозга на тревожность крыс в приподнятом крестообразном лабиринте

Изучение влияния воды с модифицированным (D/H) изотопным составом на тревожность крыс в нормальных условиях и после воздействия гипоксии в тесте ПКЛ показало, следующие результаты (рисунок 3). Используемая нами модель острой гипоксии с гиперкапнией не оказала влияния на уровень тревожности лабораторных животных. Уровень двигательной активности (количество заходов в закрытые и открытые рукава лабиринта, время нахождения в закрытых рукавах и центре), а также уровень исследовательской активности (количество ориентировочных реакций, количество свешиваний) в этих группах животных (150+гипоксия, 50+гипоксия) достоверно не отличались от интактных животных.

У животных 2 группы (50 ppm - 6 недель) значения данных показателей были достоверно ниже, чем у контрольных животных. Таким образом, вызванный изотопный D/H обмен в тканях головного мозга, на фоне длительного применения ОДВ, при нормоксических условиях оказал умеренный анксиолитический эффект.

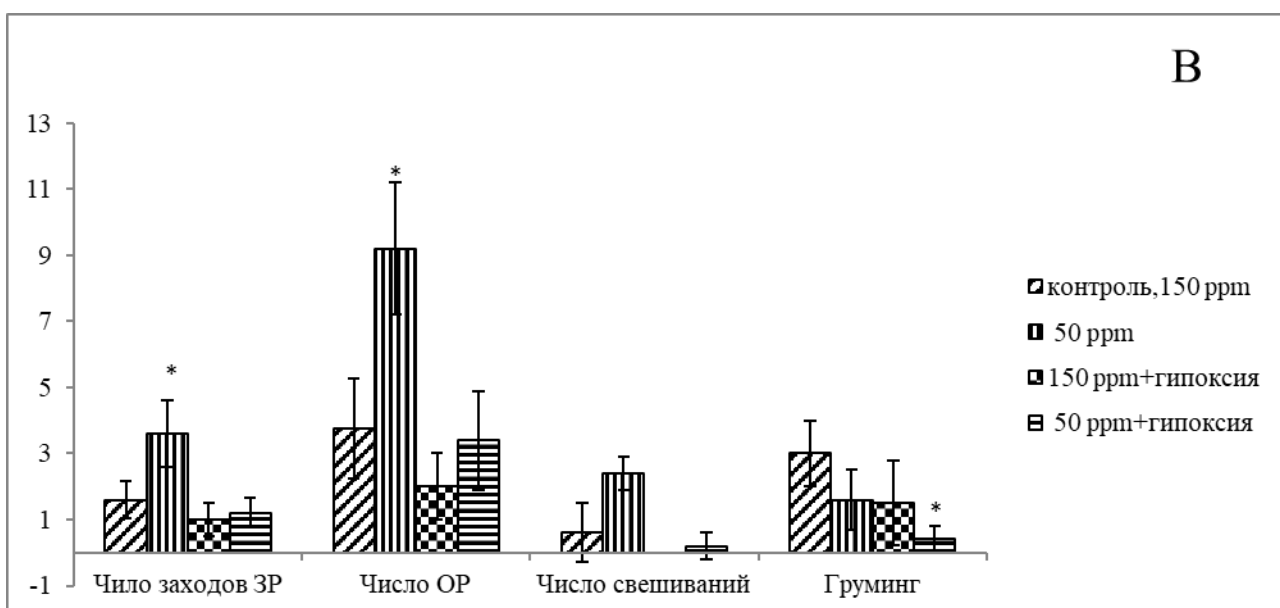
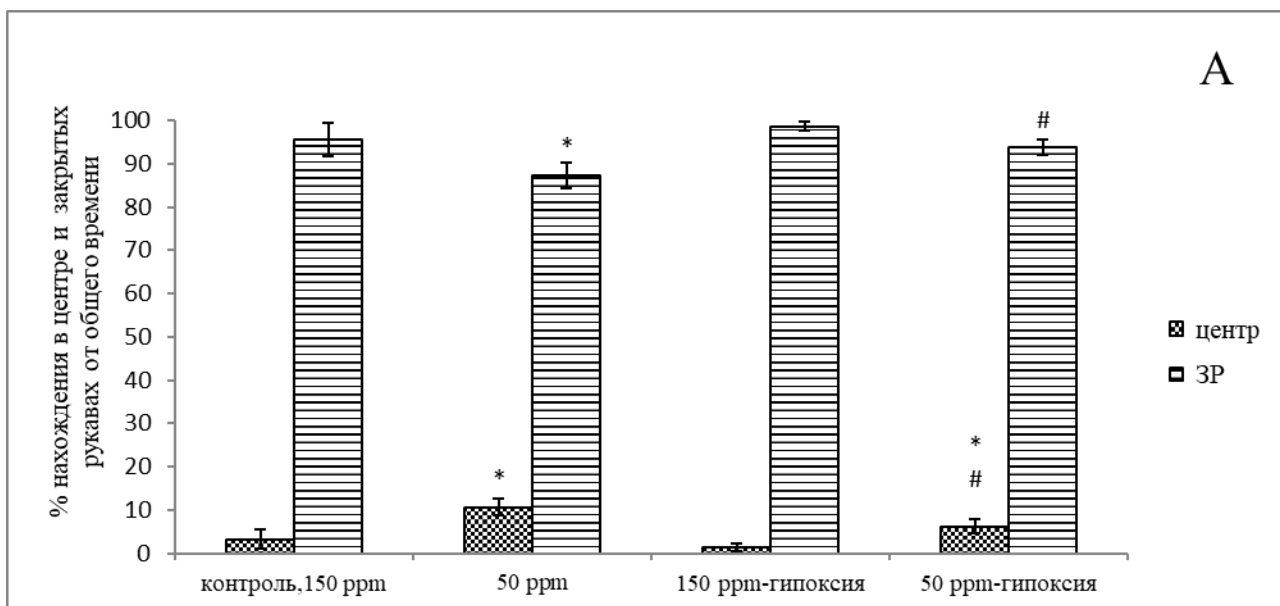


Рисунок 3 - Влияние изотопного D/H обмена в тканях головного мозга на тревожность крыс в нормальных условиях и через сутки после гипоксии в тесте ПКЛ. А) Время нахождения в центре и закрытых рукавах. В) число заходов в закрытые рукава, ориентировочные реакции (ОР), свешивания, груминг. * - $p < 0.05$, по сравнению с контролем, # - $p < 0.05$ в сравнении с группой 150 ppm - гипоксия. Данные представлены $M \pm m$

3.4 Влияние изотопного обмена D/H в тканях мозга на выработку условно - рефлекторной реакции в «Т – лабиринте»

Исследование влияния изотопного D/H обмена в тканях головного мозга на выработку условного рефлекса с положительным подкреплением у крыс в условиях нормы и гипоксии с гиперкапнией в Т-образном лабиринте (рисунки 4,5) показало, что ОДВ в норме не оказывает влияния на обучаемость животных. Число правильных побегов в группе 2 (50 ppm - 6 недель) во все дни обучения практически не отличалось от таковых в контроле. Достоверно ниже (на 23,0%), чем в контроле в первый день обучения было число правильных побегов у животных группы 3 (150 ppm +гипоксия - 6 недель). На второй день процент правильных побегов в этой группе хотя и повысился до 56,7 %, однако был ниже, чем в контроле (68,0 %). Тенденция к повышению обучаемости крыс в группе 3 (150 ppm +гипоксия - 6 недель) отмечалась и в последующие дни. На четвертый день процент правильных побегов практически не отличался от контроля. В то время как в группе 4 (50+гипоксия-6 недель) число правильных побегов во все дни исследования находилось на уровне контроля (группа 1) при этом в первый день оно достоверно превышало таковое в группе 3 (150 ppm + гипоксия- 6 недель). Кроме того, в группе 3 (150 ppm +гипоксия-6 недель) наблюдались выраженные отличия и во времени выполнения условно-рефлекторной реакции. Так, несмотря на то, что в первый день обучения у всех животных время принятия решения было самым длительным, в группе 3 (150 ppm + гипоксия-6 недель) оно достоверно превышало (на 66,7 %) таковое в контрольной группе и на 52,7 % в группе крыс, получавших воду с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm - 6 недель) и подвергнутых гипоксии (группа 50 ppm).

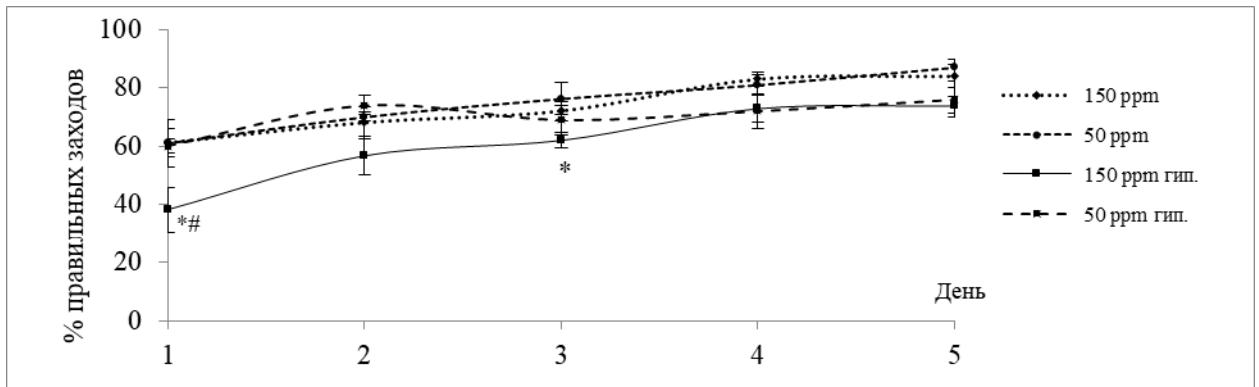


Рисунок 4 – Влияние изотопного D/H обмена в тканях головного мозга в норме и при воздействии гипоксии на % правильных побегов в тесте «Т-образный лабиринт». * - $p < 0.05$ в сравнении с контролем, # - $p < 0.05$ - в сравнении с группой 150 ppm - гипоксия Данные представлены в виде $M \pm m$

И, хотя время принятия решения с каждым днём постепенно сокращалось во всех группах, в группе 3 оно было более длительным, чем в контроле (с 1 по 3 день), и достоверно более продолжительным, чем в группе 4 (1 и 3 дни). И только на четвертый день обучения время выполнения условно-рефлекторной реакции во всех группах практически не отличалось от контроля.

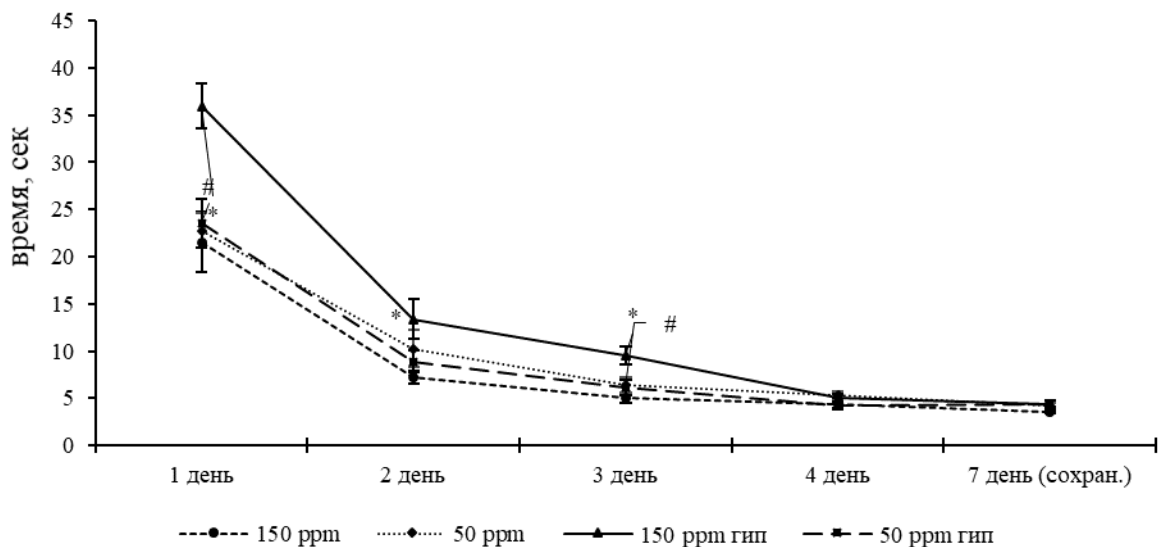


Рисунок 5 – Влияние изотопного D/H обмена в тканях головного мозга на время выполнения условно-рефлекторной реакции в тесте «Т-образный лабиринт». * - $p < 0.05$, по сравнению с группой «контроль», # - $p < 0.05$ - «50 ppm, гипоксия» в сравнении с «150 ppm, гипоксия». Данные представлены в виде $M \pm m$

Через двое суток после окончания обучения у всех животных сохранились навыки условно-рефлекторной реакции двустороннего чередования право- и левосторонних побежек, при этом существенных отличий между группами не было. Не было отличий и во времени выполнения условно-рефлекторной реакции.

Таким образом, установлено, что длительное применение ОДВ в норме не оказало влияния на обучаемость животных, в то время как применение её до гипоксического воздействия (воздействие амнезирующего фактора) способствовала сохранению обучаемости и памяти на уровне контроля, т.е. оказала умеренный антиамнестический эффект.

Наблюдаемый нами умеренный антиамнестический эффект на фоне острой гипоксии, вызванный продолжительным приемом ОДВ, возможно связан с антиоксидантным эффектом, который оказывает продолжительный прием ОДВ на ткани головного мозга. Развитие процессов перекисного окисления и дефицит макроэргических соединений в тканях головного мозга на фоне перенесенной острой гипоксии приводит к нарушению ионной проводимости мембранных каналов и как следствие нарушению генерации и проводимости нервных импульсов. Развитие данных патологических процессов отражается на когнитивных и эмоциональных реакциях животных. Снижение окислительного стресса приводит к структурной целостности мембран нейронов, поддержанию пропускной способности ионных каналов и как следствие сохранению интегративной деятельности ЦНС.

3.5 Изучение действия D/H – обмена на культуру тканей мозжечка

3.5.1 Исследование влияния D/H – обмена на уровень АФК и Ca^{2+} , величины МПМ нейронов мозжечка

Инкубация нейронов в среде с низкой концентрацией дейтерия (50 ppm) приводила к достоверному снижению интенсивности свечения дигидрорамина 123 при концентрациях сукцината 25, 50, 100 и 200 мкМ, что

свидетельствовало о снижении продукции активных форм кислорода в цитозоле клеток (рисунок 6 - А).

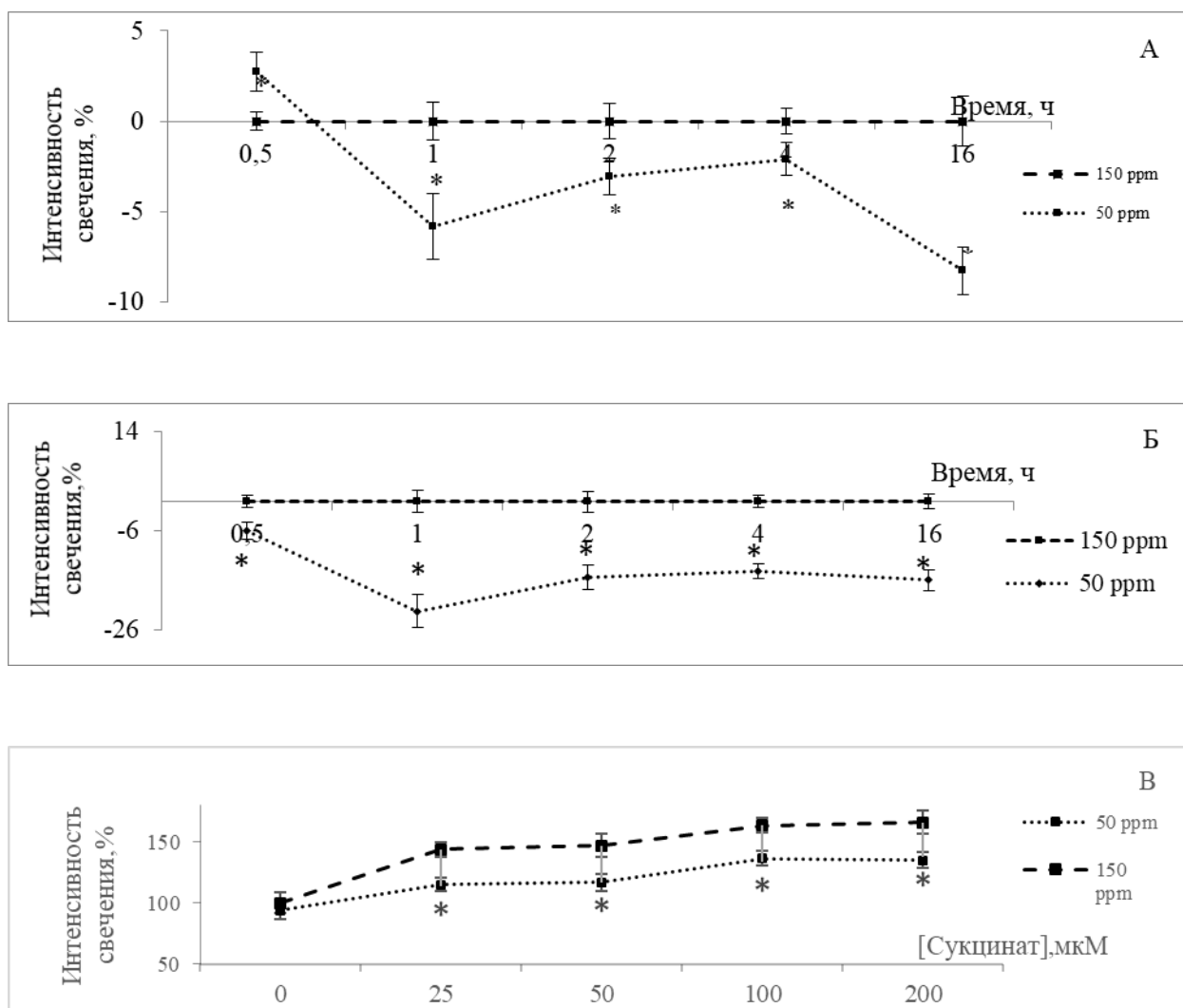


Рисунок 6 - Влияние среды с различным содержанием дейтерия на интенсивность флуоресцентных зондов. А) значение МППМ в культивируемых нейронах мозжечка крысы; Б) содержание ионов кальция в цитозоле нейронов мозжечка; В) продукция АФК в цитозоле нейронов мозжечка. Примечание: по оси ординат – интенсивность свечения в %. Данные представлены в виде $M \pm m$ в % от 150 ppm при концентрации сукцината 0 мкМ

МППМ, измеренный с помощью флуоресцентного зонда - TMRE, после тридцатиминутной инкубации в среде, приготовленной на ОДВ, достоверно увеличивался на 3 % по сравнению с контрольной средой. Последующая инкубация нейронов мозжечка в инкубационном растворе с низкой концентрацией дейтерия способствовала уменьшению МППМ (рисунок 6 - Б).

Так наименьшая светимость зонда наблюдалась через 1 час и 16 часов инкубации на 6 и 8 % соответственно ($p < 0,05$). Относительная концентрация ионов кальция в цитоплазме нервных клеток также достоверно уменьшалась через 1, 2, 4 и 16 часов после инкубации ($p < 0,05$) в ИСР, приготовленном на ОДВ (рисунок 6 - В). Максимальное снижение наблюдалось через час инкубации (на 22%), при дальнейшем воздействии концентрация ионов кальция значительно не изменялась, и уменьшилось в среднем на 15%.

3.5.2 Влияние изотопного обмена D/H на выживаемость нейронов мозжечка при глюкозной депривации и температурном стрессе

Анализ результатов экспериментов по исследованию влияния среды с пониженным содержанием дейтерия на уровень гибели нейронов при ГД показал следующее (таблица 5). Уровень гибели нейронов при ГД в среде с природным содержанием дейтерия (группа 150 ppm + ГД) возрастал на ($21 \pm 3,1$ %), тогда как в среде с пониженным содержанием дейтерия (группа 50 ppm + ГД) уровень гибели нейронов возрастал на ($39 \pm 4,0$ %), по отношению к культурам, не подвергшимся ГД в среде с природным уровнем дейтерия (группа «150 ppm»). Кроме того, в культурах, помещенных в среду с пониженным содержанием дейтерия и не подвергшихся ГД (группа 50 ppm), уровень гибели нейронов был на ($9 \pm 1,5$ %) выше, чем в культурах, помещенных в среду с природным уровнем дейтерия.

Таким образом, ГД достоверно увеличивала гибель нейронов мозжечка в среде, как с природным, так и с пониженным содержанием дейтерия, что хорошо согласуется с литературными данными [Генрихс Е.Е. и др., 2017]. При этом среда с пониженным содержанием дейтерия оказывала дополнительное стрессовое воздействие на культуру нейронов мозжечка, что проявлялось в повышении гибели нейронов, как при ГД, так и в её отсутствие.

Таблица 5 – Гибель культивируемых нейронов мозжечка при ГД в средах с различным содержанием дейтерия

Группа	Гибель нейронов мозжечка, %
150 ppm	100 ± 2,4
50 ppm	109 ± 1,5*
150 ppm + ГД	121 ± 3,1*
50 ppm + ГД	139 ± 4,0 *, #

Примечание: Данные представлены $M \pm m$. 150 ppm – культуры, которые инкубировались в среде с природным содержанием дейтерия; 50 ppm – культуры, которые инкубировались в среде с пониженным содержанием дейтерия; 150 ppm + ГД – культуры, которые инкубировались в среде с природным содержанием дейтерия и подверглись ГД; 50 ppm+ ГД – культуры, которые инкубировались в среде с пониженным содержанием дейтерия и подверглись ГД. * - $p < 0.05$ по отношению к 150 ppm, # - $p < 0.05$ по отношению к 150 ppm + ГД.

Анализ результатов экспериментов с температурным стрессом (рисунок 7) показал, что при температуре 22 °С в целом влияние среды со сниженным содержанием дейтерия на уровень гибели нейронов прослеживается достаточно слабо, и достоверных отличий при соответствующих концентрациях сукцината от среды с естественным содержанием дейтерия нет. Исключение составила группа с концентрацией сукцината 200 мкМ, когда уровень гибели в среде со сниженным содержанием дейтерия и температуре 22°С достоверно выше, чем в среде с содержанием дейтерия 150 ppm. Однако, при воздействии температуры 39 °С в культурах, помещённых в среду с концентрацией дейтерия 50 ppm, и концентрациях сукцината 50, 100 и 200 мкМ уровень гибели достоверно выше, чем в культурах, помещённых в среду с концентрацией дейтерия 150 ppm с соответствующей концентрацией сукцината. При сравнении уровня гибели в группах по отношению к контрольной (150 ppm 0 мкМ сукцината) выяснилось, что при 22 °С и 39 °С и возрастающих концентрациях сукцината (50, 100 и 200 мкМ) среда с пониженным содержанием дейтерия способствует повышению гибели нейронов.

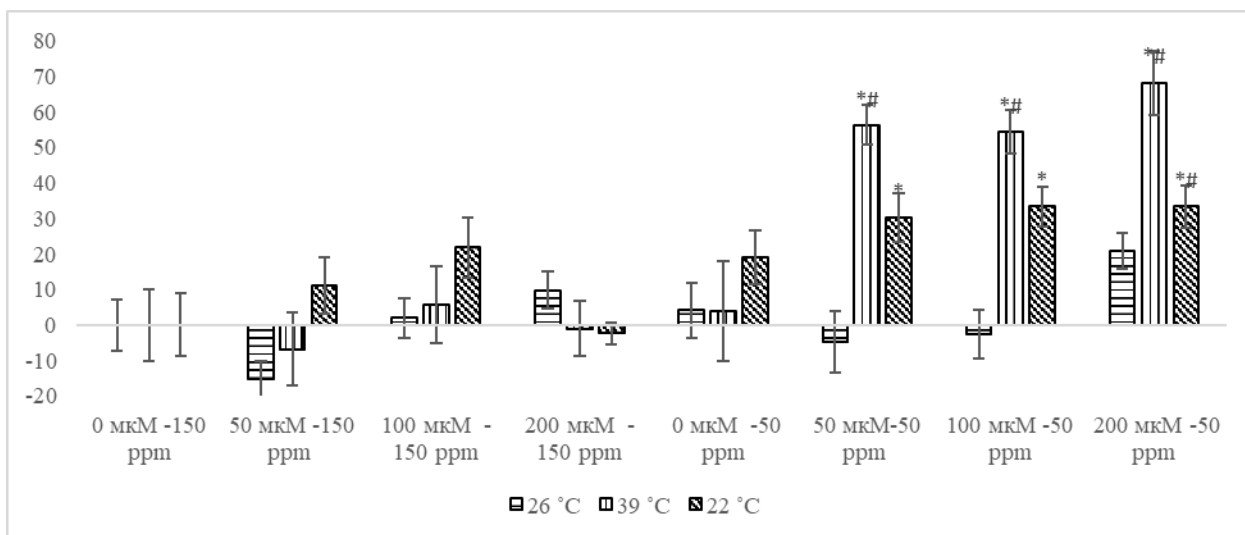


Рисунок 7 – Гибель нейронов мозжечка в зависимости от температуры и концентрации сукцината в ИСР с разной концентрацией дейтерия. Данные представлены $M \pm m$. * - $p < 0.05$ относительно точки 150 ppm 0 мкМ сукцината; # - $p < 0.05$ сравнение точек 150 и 50 между собой при одной и той же концентрации сукцината.

3.6 Изменение электрофизиологических показателей срезов гиппокампа

Результаты электрофизиологических исследований представлены на рисунках 8 и 9. При переключении системы протока и ИСР1 на ИСР2 происходило угнетение амплитуды ПС во всех исследуемых срезах гиппокампа. Эффект развивался постепенно и достигал своего максимального значения в среднем через 1,5 – 2 минуту после переключения и выходил на плато. При этом амплитуда ПС достоверно уменьшалась на 20 % по сравнению с контролем – ИСР1. При обратном переключении с ИСР2 на ИСР1 во всех случаях происходило постепенное восстановление амплитуды ПС. Максимальный эффект наблюдали в среднем через 1-1,5 минуты после начала реинфузии.

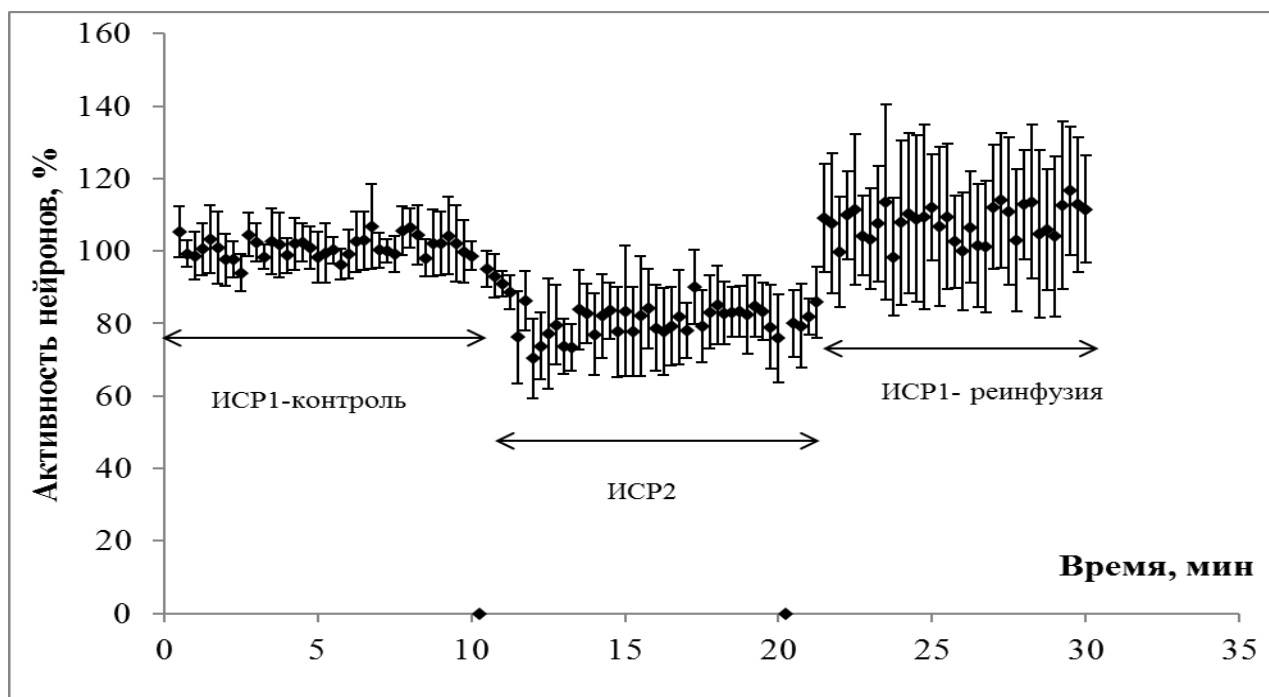


Рисунок 8 - Уменьшение вызванной активности нейронов в поле CA1 гиппокампа при инкубации в среде с пониженным содержанием дейтерия.

Примечание: на оси ординат представлена амплитуда поп-спайка в % по отношению к исходной средней величине. ИСР1 – инкубационный солевой раствор, приготовленный на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm). ИСР2 – инкубационный солевой раствор, приготовленный на воде с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm). Стрелочкой отмечено действие разных инкубационных растворов

При этом величина восстановленного ПС составила 108 % от исходного значения. Таким образом, десятиминутная инкубация срезов в среде с пониженным содержанием дейтерия приводила к достоверному снижению электрической активности нейронов гиппокампа крыс. Возращение срезов в инкубационную среду с природным содержанием дейтерия приводило к полному восстановлению электрической активности.

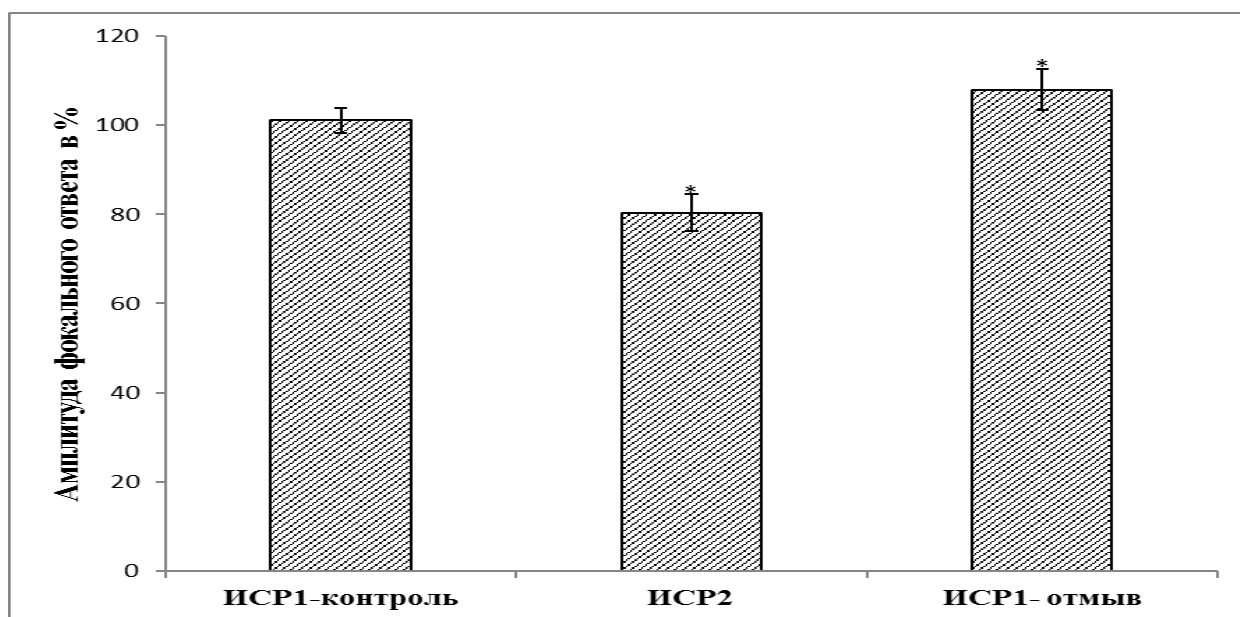


Рисунок 9 - Сравнение амплитуды фокального ответа, выраженной в % по отношению к исходной средней величине ответов.

Примечание: ИСП1 – инкубационный солевой раствор, приготовленный на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm). ИСП2 – инкубационный солевой раствор, приготовленный на воде с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm). * – $p < 0.05$ относительно ИСП1 – контроль.

В литературе имеются данные, указывающие на то, что мишенью воздействия низких и высоких концентраций дейтерия среды могут быть митохондрии клеток. Экспериментально обнаружено, что изменение концентрации дейтерия в среде сдвигает редокс-потенциал митохондрий раковых и нормальных клеток. Это выражается изменением уровня окисленных митохондриальных белков (Zhang, 2019), активацией или ингибированием продукции АФК в этих органеллах (Zhang, 2019; Wu, 2020), в зависимости от содержания дейтерия в среде. Сдвиг соотношения D/H в среде вызывал снижение эффективности окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крыс [Лобышева, 2020]. Наблюдаемые нами эффекты в экспериментах *in vitro* возможно также связаны с влиянием вызванного изотопного D/H обмена на функциональную активность митохондрий нейронов. Существует предположение, что концентрация дейтерия в матриксе митохондрий меньше,

чем в их межмембранном пространстве, это связано с более низкими концентрациями дейтерия в основных источниках метаболической (матриксной) воды - органических жирах [Boros, 2016]. Снижение концентрации дейтерия в среде приводит к уменьшению содержания дейтерия на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий, в результате концентрация дейтерия внутри митохондрии становится больше. Таким образом, снижение концентрации дейтерия в окружающей воде меняет концентрационный градиент дейтерия на внутренней мембране митохондрий (Zhang, 2019). Есть версия, что изменение дейтериевого градиента по обе стороны внутренней мембраны митохондрий нейронов способствует пока еще неизвестному механизму открытию протонных каналов и устремлению потока H^+ внутрь митохондрии, таким образом, способствуя уменьшению МПМ.

Величина МПМ зависит от концентрационного градиента ионов водорода по обе стороны внутренней мембраны. Таким образом, снижение МПМ может быть следствием накопления протонов в матриксе митохондрий. Мы предполагаем, что причинами, по которым это может происходить в низкодейтериевой среде, могут быть увеличение протонного тока в сторону матрикса через АТФ-синтазу и уменьшение потока ионов водорода обратно через протонные каналы интегральных белков 3, 4 комплекса ЭТЦ. Перемещение протонов в роторе АТФ-синтазы происходит за счет эстафетной передачи по протон-донорным и протон-акцепторным группам аминокислот (арг., тир., гл.) по водородным связям. Обратный перенос протона против градиента его концентрации осуществляется по протонным каналам, пронизывающих 3 и 4 комплекс ЭТЦ. Перемещение протона в этих каналах происходит также по цепочке водородных связей, образованных между кластерами воды и группами аминокислотных остатков по механизму Гротгуса (Vygodina, 1997; Konstantinov, 1997). Наличие дейтрона в роторе АТФ-синтазы и в протонном канале трансмембранных белков 3,4 комплексов ЭТЦ может привести к упрочнению водородных связей и уменьшению скорости переноса, поэтому естественное соотношение D/H во внутренней среде

организма создает оптимальные условия для работы протонных переносчиков. Изменение соотношения D/H в клетке изменяет кинетико-термодинамические параметры белков-переносчиков, пронизывающих внутреннюю мембрану митохондрий, что и приводит к уменьшению концентрационной составляющей МПМ и как следствие его снижению. Снижение митохондриального потенциала так же может быть вызвано нарушением работы электрон-транспортной цепи митохондрий. Возможно, объектами D/H обмена могут быть 3 и 4 комплексы ЭТЦ. Комплекс 3 или Q-комплекс катализирует окисление убихинола цитохромом c, с помощью Fe-S кластера (белка Риске) и цитохромной цепочки b (b_l и b_h) c₁. Белок Риске находится на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий, как и гем c₁. А цитохром c четвертого комплекса ЭТЦ способен спокойно диффундировать в межмембранное пространство. Оба комплекса имеют контакт с растворителем, что дает основание, предположить, что оба комплекса могут быть доступными для D/H обмена. К тому же оба комплекса осуществляют протондвижущие циклы, в результате которых формируется трансмембранный потенциал митохондрий. Известно, что белок Риске является конформационно подвижным белком, осуществляя перенос электрона от убихинола на цитохром c₁. Последний же в свою очередь транспортирует электроны на 4 комплекс ЭТЦ: цитохром c-оксидазу. Вероятно, вызванный изотопный D/H обмен, может привести к изменению кинетических параметров переноса электрона по ЭТЦ, что в свою очередь может привести к нарушению переноса протона через каналы комплексов ЭТЦ и закислению матрикса митохондрий. Работа АТФ-синтазы зависит от МПМ, т. о. его сдвиг приводит к нарушению синтеза АТФ. Транспорт ионов через плазматическую мембрану осуществляется белками-транспортерами, работа которых является АТФ-зависимым процессом. Так, Na⁺/K⁺ -атфаза осуществляет перенос ионов калия внутрь клетки, а ионов натрия в межклеточное пространство, осуществляя генерацию потенциала действия в возбудимых тканях. Уменьшение синтеза АТФ приводит к нарушению генерации потенциала действия в нейронах. Наблюдаемое нами

снижение популяционного спайка в нейронах гиппокампа в среде с низкой концентрацией дейтерия является следствием нарушения синтеза АТФ в митохондриях. Снижение ионов кальция в цитоплазме нейронов мозжечка в среде с низкой концентрацией дейтерия может быть связано с изменением работы Ca^{2+} -транспортёров, приводящее к накоплению данных катионов. Дигидрорадамин 123, используемый нами для детекции АФК, проявляет наибольшую чувствительность к таким высокореакционным радикалам как пероксинитрит и гипохлорит. Продукция первого зависит от генерации оксида азота, синтез которого осуществляется Ca^{2+} -зависимой NO-синтазой. Таким образом, наблюдаемое нами снижение интенсивности флуоресценции данного зонда возможно связано с уменьшением активности NO-синтазы за счет снижения ионов кальция в нейронах мозжечка. Повышение гибели нейронов мозжечка в среде с низкой концентрацией дейтерия при воздействии ГД и температурного стресса также может происходить за счет дефицита макроэргических соединений, происходящих в клетках на фоне D/H обмена.

3.7 Влияние среды с низким содержанием дейтерия на активность пероксидазы хрена в модельных системах

3.7.1 Пероксидазное окисление о – дианизидина пероксидом водорода

Зависимость начальной скорости реакции пероксидазного окисления о-дианизидина от начальной концентрации пероксидом водорода в средах с разным содержанием имеет общий характер. Эта зависимость имеет линейный характер при малых концентрациях перекиси водорода от 0,01 до 0,1 мМ как в среде с природным содержанием дейтерия (150ppm), так и в среде с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm). Это указывает на то, что в данном диапазоне концентраций окислителя ферментативная реакция имеет первый порядок реакции. Дальнейшее увеличение концентрации субстрата окислителя от 0,25 до 1мМ приводит график к выходу на плато, где начальная скорость реакции практически перестает зависеть от концентрации перекиси,

т.е. порядок ферментативной реакции становится нулевым. Таким образом, в диапазоне концентраций от 0,01 до 1 мМ данная ферментативная реакция описывается уравнением Михаэлиса - Ментен. При более высоких концентрациях перекиси (больше 1мМ) в обеих средах данная реакция перестает работать по схеме Михаэлиса – Ментена, т.к. происходит ингибирование реакции пероксидазного окисления о - дианизидина пероксидом водорода. В среде, приготовленной на ОДВ, начальная скорость реакции достоверно меньше, чем в среде с концентрацией дейтерия 150 ppm во всех исследуемых точках (рисунок 10).

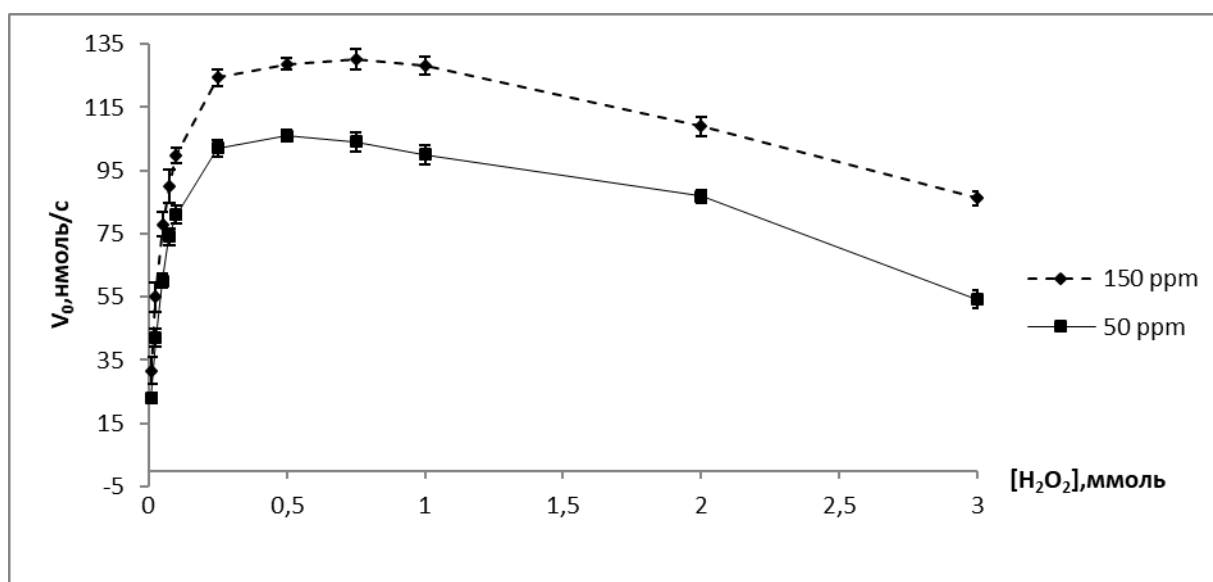


Рисунок 10 - Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления о – дианизидина от начальной концентрации перекиси водорода в среде с пониженным содержанием дейтерия при рН=7.5. Данные представлены $M \pm m$

Линеаризацию проводили в двойных обратных координатах Лайнуивера - Берка и координатах Иди – Хофсти при таких концентрациях окислителя при которых ферментативная реакция подчиняется уравнению Михаэлиса – Ментен (рисунок 11 и 12). По результатам построения этих графиков были найдены максимальная скорость реакции и константа Михаэлиса (таблица 6).

Анализ полученных экспериментальных прямых в двух координатных системах показал, что максимальная скорость реакции окисления о - дианизидина

пероксидом водорода ПХ была выше в среде, приготовленной на воде с природным содержанием дейтерия. Константа Михаэлиса, полученная в координатах Лайнуивера - Берка была выше на 26 % для ферментативной реакции, протекающей в буфере, приготовленном на ОДВ. В координатах Иди - Хофсти данный показатель был больше на 20 % в среде с уменьшенной концентрацией дейтерия. Данный факт указывает, что сродство субстрата с ферментом в данной модельной системе становится меньше в среде, где содержание дейтерия было в три раза меньше природного.

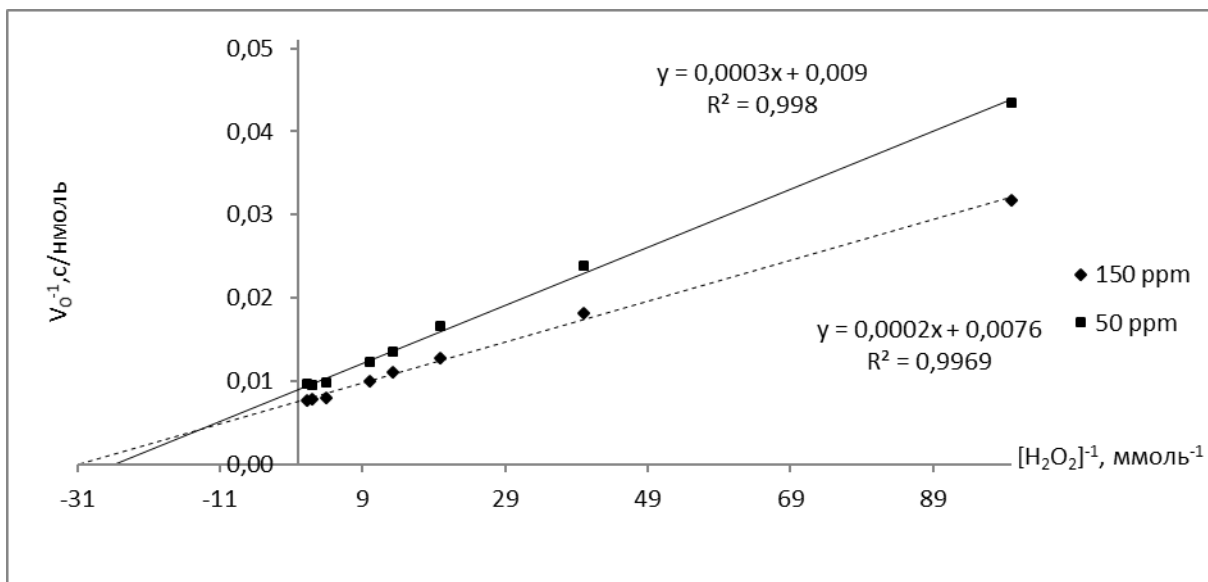


Рисунок 11 - Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления о – дианизидина от начальной концентрации перекиси водорода в координатах Лайнуивера – Берка в среде с пониженным содержанием дейтерия при рН=7.5

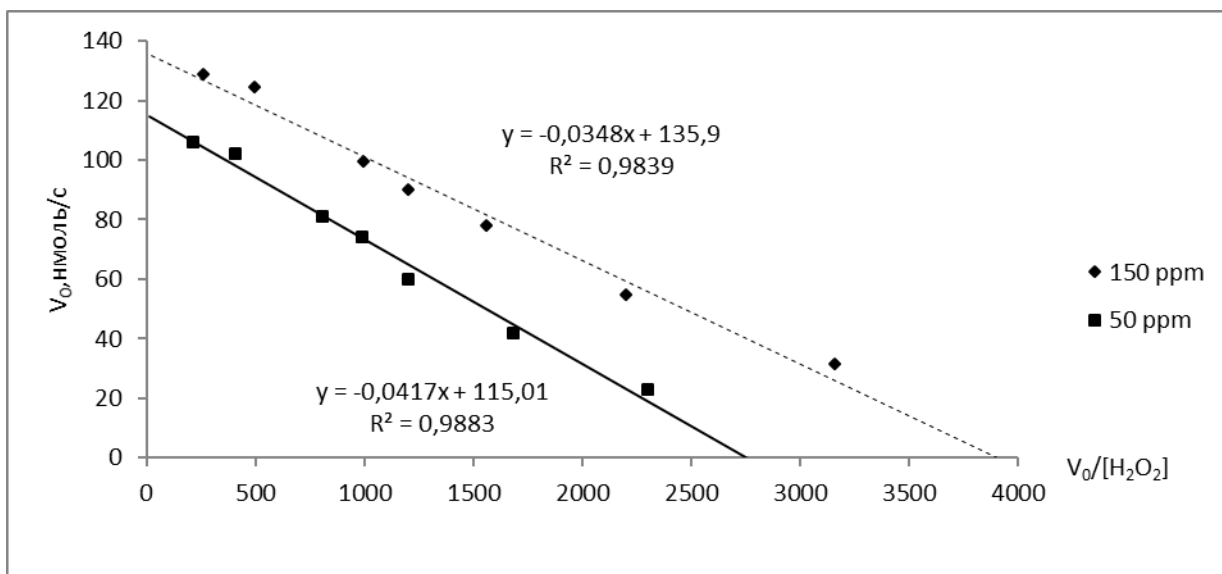


Рисунок 12 - Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления о – дианизидина от начальной концентрации перекиси водорода в координатах Иди – Хофсти в среде с пониженным содержанием дейтерия при pH=7.5

3.7.2 Пероксидазное окисление люминола пероксидом водорода

Изучение хемилюминесцентной реакции пероксидазного окисления люминола пероксидом водорода в средах с разным содержанием дейтерия показало следующие результаты. Интегральный показатель свечения, а также тангенс угла наклона кривой нарастания (рисунок 13) были достоверно ($p < 0,05$) меньше в реакционной среде, приготовленной на воде с концентрацией дейтерия- 50 ppm (таблица 6). Данные кинетические параметры отражают интенсивность свечения, развиваемого в ходе пероксидазного окисления люминола. Интенсивность хемилюминесценции данной реакции пропорциональна скорости генерации радикалов люминола. Таким образом, уменьшение интенсивности хемилюминесценции при окислении люминола пероксидазой хрена в среде, приготовленной на ОДВ, можно объяснить снижением активности фермента в данных условиях реакции.

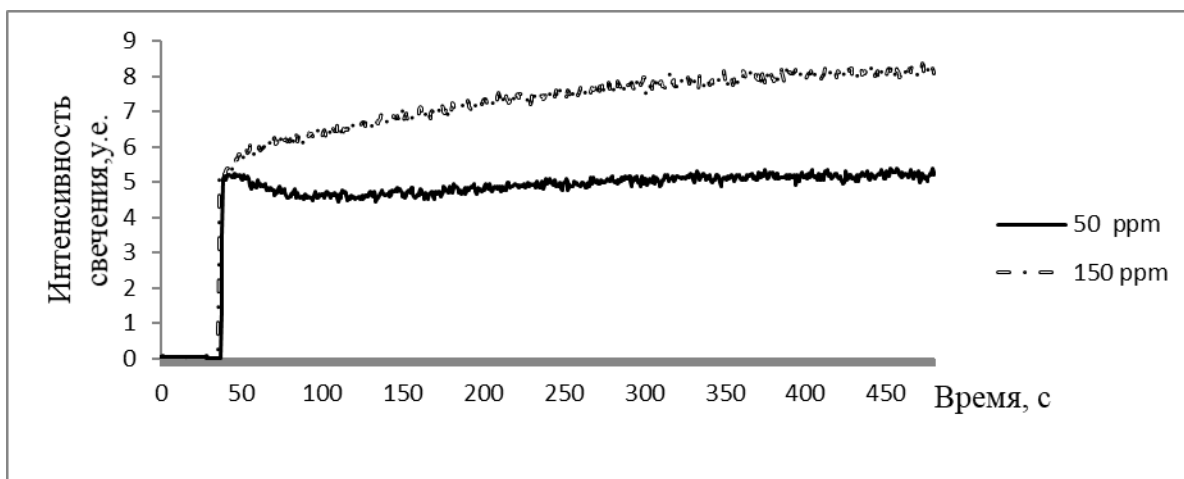


Рисунок 13 - Кинетическая кривая хемилюминесцентной реакции окисления люминола пероксидазой хрена в среде с пониженным содержанием дейтерия

Таблица 6 - Показатели активности пероксидазы хрена в средах с разным содержанием дейтерия

D/H Среды, ppm	K_m (Л.-Бера), мМ	K_m (Иди- X.), мМ	V_{max} (Л. - Бера), нмоль/с	V_{max} (Иди- X.), нмоль/с	Светосум ма, у. е.	$tg\alpha$
150	0,026±0,002	0,035±0,003	131	136	3637±49	0,0053±10 ⁻⁴
50	0,033±0,001	0,042±0,003	111	115	2557±124	0,0019±10 ⁻⁴

3.8 Изучение структуры пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина в среде с пониженным содержанием дейтерия

3.8.1 Спектры триптофановой флуоресценции пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина

При возбуждении светом длиной волны 297 нм спектр флуоресценции для БСА имеет максимум испускания 335 нм, а для ПХ 330 нм. Интенсивность флуоресценции БСА была примерно в 10 раза выше, чем у ПХ. Данные отличия вызваны разным количеством триптофана в молекулах этих белков, а также разным его микроокружением. Белок БСА имеет два триптофановых остатка, один из них расположен внутри, а другой на поверхности молекулы. Взаимодействие поверхностного триптофана БСА с молекулами растворителя приводит к смещению максимума длины волны испускания в длинноволновую

область. Несмотря на то, что в ферменте единственный триптофановой остаток, расположен внутри гидрофобной части молекулы, его спектр флуоресценции также имеет длинноволновый максимум. Это вызвано взаимодействием между триптофаном и гемом фермента. Снижение концентрации дейтерия в растворителе не вызвало заметного сдвигов максимума эмиссии в коротковолновую или длинноволновую область спектра. Помещение белков в растворитель с концентрацией дейтерия 50 ppm привело к снижению интенсивности флуоресценции в обоих образцах (рисунок 14).

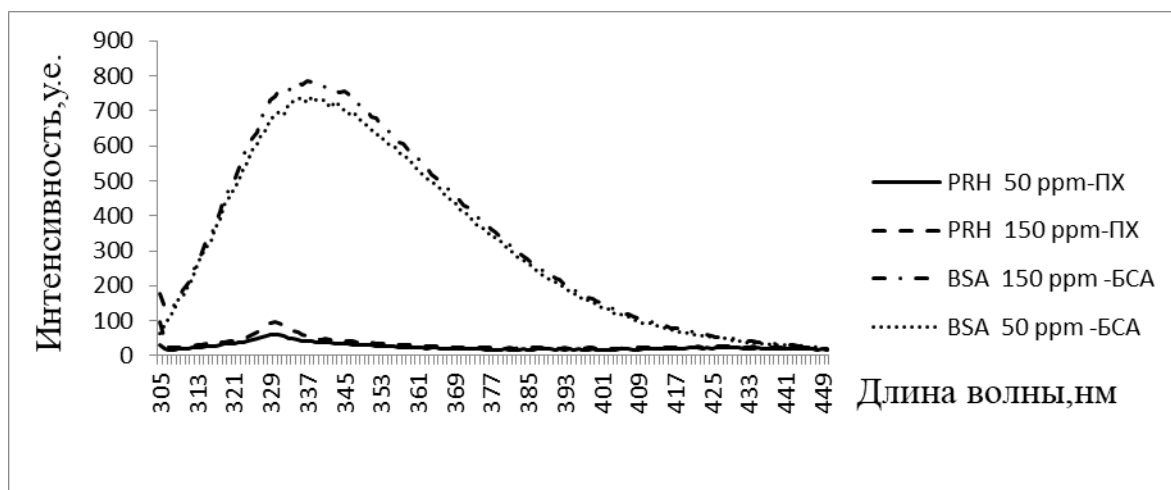


Рисунок 14 - Спектры триптофановой флуоресценции БСА и ПХ в среде с пониженным содержанием дейтерия

3.8.2 Спектры совместной триптофановой и тирозиновой флуоресценции пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина

Количество тирозина в белке БСА составляет девятнадцать против семи в молекуле ПХ. При возбуждении светом с длиной волны 280 нм интенсивность флуоресценции БСА была примерно в 2,5 раза выше, чем в ПХ. Для БСА интенсивность флуоресценции при длине возбуждения 280 и 297 нм практически не отличается (разница составила 5%). Это может означать, что основной вклад в совместную флуоресценцию БСА вносят остатки триптофана.

В ПХ происходит резкое увеличение интенсивности флуоресценции при 280 нм. Таким образом, основной вклад в совместную флуоресценцию фермента вносят тирозиновые остатки. Максимум испускания для БСА составил 335 нм, а для ПХ 310 нм. Коротковолновый максимум флуоресценции у молекулы ПХ возможно связан с гидрофобным окружением тирозиновых остатков. Среда с пониженным содержанием дейтерия не повлияла на положение максимумов в спектрах опытных белков, но при этом вызвала снижение интенсивности флуоресценции (рисунок 15).

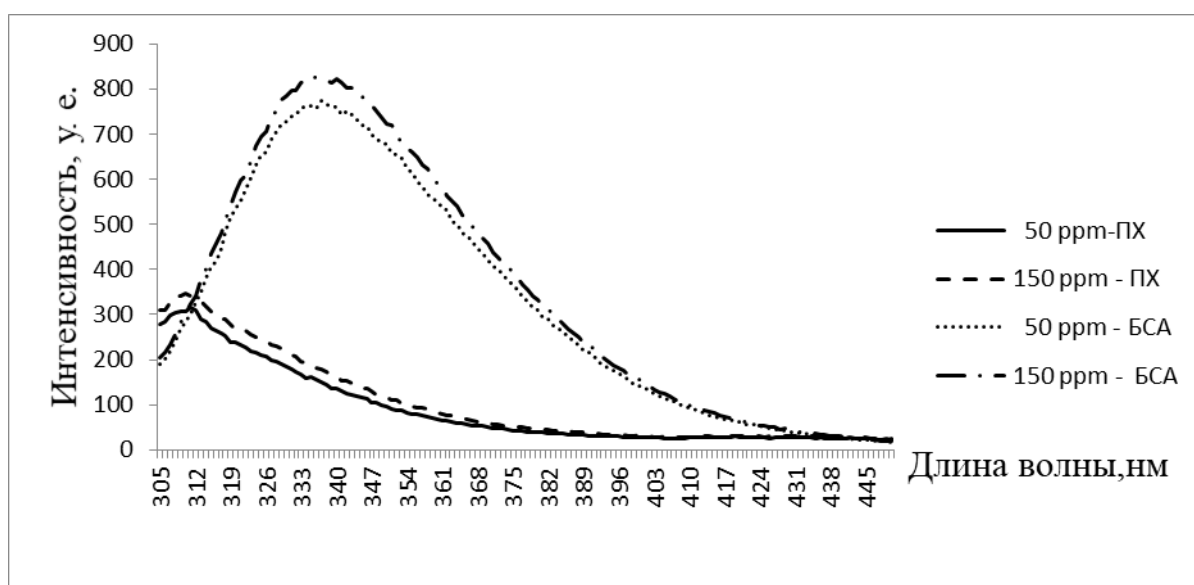


Рисунок 15 - Спектры совместной триптофановой и тирозиновой флуоресценции БСА и ПХ в среде с пониженным содержанием дейтерия

3.8.3 КД – спектры пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина

Спектры КД в далекой УФ-области для обоих белков имеют два минимума в области 207 - 220 нм. Для ПХ кривая пересекает нулевую линию в точке 199 нм, а для БСА эта точка 201 нм. Спектры с такой амплитудой и формой характерны для глобулярных белков с высокоупорядоченной вторично й структурой. Эллиптичность при 220 нм является мерой упорядоченности

структуры белка. Амплитуда спектра ПХ в данной точке в 2,5 раза больше чем у БСА, что говорит о большом содержании β - слоев во вторичной структуре БСА (рисунок 16). При этом уменьшение концентрации дейтерия в растворителе не оказало влияния на вторичную структуру обоих белков.

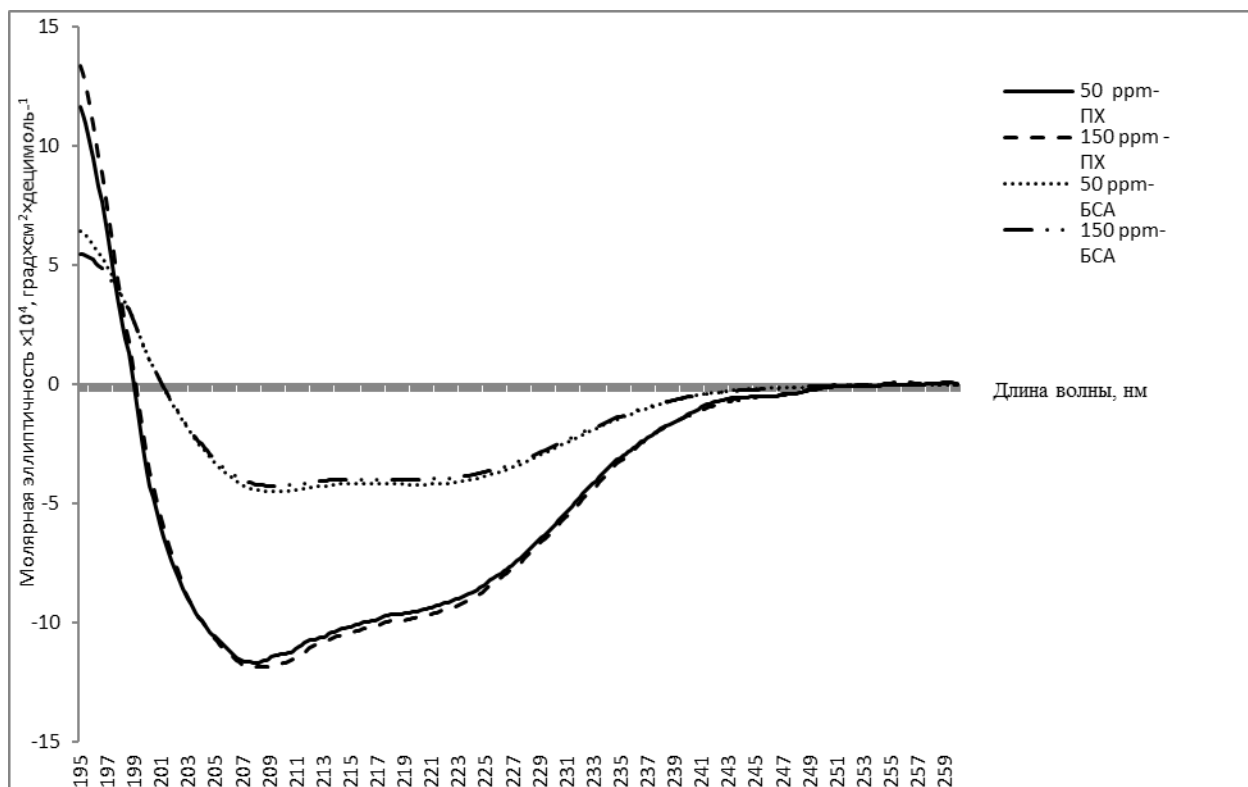


Рисунок 16 - КД – спектры (дальний УФ - диапазон) ПХ и БСА в среде с пониженным содержанием дейтерия

У БСА основными тушителями триптофановой флуоресценции являются молекулы растворителя – воды, а также тирозиновые остатки за счет переноса энергии по диполь - дипольному механизму. У молекулы ПХ основным акцептором энергии триптофана и тирозина является простетическая группа - гем. Также безизлучательный перенос энергии с этих хромофоров возможен за счет их ферстеровского взаимодействия.

Можно было предположить, что тушение собственной тирозиновой и триптофановой флуоресценции в среде с пониженным содержанием дейтерия, как раз происходила по одному из выше указанных механизмов. Однако, КД -

спектрометрия не показала заметного изменения во взаимном расположении гем - триптофан в молекуле ПХ, и триптофан - тирозин в обоих белках. Также не наблюдался сдвиг максимумов спектров испускания в обоих белках при изменении концентрации дейтерия в растворителе, что указывает о постоянном окружении хромофоров.

Известно, атомы водорода, связанные с атомами, имеющими свободную пару электронов, претерпевают обычно быстрый обмен с другими атомами водорода. Помещение биополимеров в среду, с измененным по дейтерию изотопным составом, приводит к изменению соотношения D/H в их структуре. Так в водных растворах белков изотопный обмен D/H происходит быстро в атомах водорода, связанных с атомом азота, серой или кислорода. Атомы водорода, связанные с углеродом практически не подвержены изотопному обмену. Изотопное замещение дейтерия на протий протекает с минимальной скоростью в экранированных гидрофобных участках молекулы, а также в составе пептидных групп, испытывающих сферическое затруднение. Напротив, D/H обмен происходит с высокой интенсивностью в функциональных группах, испытывающих контакт с растворителем [Мухачев В.М.,1975]. Вероятно, помещение исследуемых белков в среду с пониженной концентрацией дейтерия вызывает локальное замещение атомов дейтерия на протий в поверхностной структуре белка, контактирующей с гидратной оболочкой. Такое замещение приводит к уменьшению энергии водородной связи между функциональными группами аминокислотных остатков с молекулами воды [Pedersen L.G.,2006]. Возможно, в результате ослабления водородных связей с молекулами растворителя, амплитуда колебаний боковых групп аминокислот, смотрящих в гидрофильную область, увеличивается [Dzhimak S.S. et al,2018]. В литературе имеются данные, что в белках тушение собственной флуоресценции может происходить за счет функциональных групп соседних аминокислотных остатков [Ross J. A. et al,2002]. Мы предполагаем, что усиление подвижности соседних аминокислотных остатков, окружающих тирозиновые и триптофановые остатки, находящиеся вблизи

поверхности белка, приводит к возрастанию вероятности переноса энергии с хромофоров на функциональные группы соседних акцепторов.

Проведенные оптические исследования структуры ПХ показали, что среда с пониженным содержанием дейтерия не вызывает конформационных изменений в структуре белка, затрагивающих активный центр фермента. Возможные локальные изменения в поверхностной структуре белка, вызванные изотопным замещением дейтерия на протий, вероятно, не могут стать причиной уменьшения ферментативной активности, наблюдаемую нами в двух модельных системах. Мы предполагаем, что ингибирование реакции пероксидазного окисления о - дианизидина и люминола пероксидом водорода в среде с пониженным содержанием дейтерия может быть связано с наличием в активном центре ПХ молекулы воды. Из литературных источников известно, что молекула воды принимает участие в механизме каталитического окисления субстратов некоторыми грибными и растительными пероксидазами [Henriksen A. et al,1999; Berglund G.I. et al,2002; Vetich N. C.,2004]. Так в ПХ, молекула воды образует водородный мостик между двумя аминокислотными остатками His42 и Pro139. Роль воды заключается в переносе протона от субстрата – восстановителя на гистидиновый остаток, а также переносе электрона с восстановителя на гем [Газарян И. Г. и др.,2006]. Как известно, молекула воды может находиться в нескольких изотопных формах по водороду: H₂O, D₂O и HDO. Вероятно, понижение концентрации дейтерия в реакционной среде может привести к частичному замещению дейтерия на протий в молекуле воды активного центра фермента, и как следствие ослабление водородной связи между аминокислотными остатками His42 и Pro139. В конечном счете, данный процесс может стать причиной уменьшения вероятности передачи протона и электрона по водородной связи от субстрата – восстановителя на реакционные группы активного центра ПХ, и снизить активность фермента.

Таким образом, снижение содержания дейтерия в реакционной среде приводит к уменьшению активности пероксидазной реакции окисления о – дианизидина и люминола пероксидом водорода в двух модельных системах.

При этом спектры кругового дихроизма не изменяются при помещении ПХ и БСА в среду с измененным изотопным составом, а интенсивность собственной флуоресценции обоих белков уменьшается. По результатам оптических измерений можно предположить, что локальные замещения дейтерия на протий затрагивают поверхность белка, не вызывая при этом заметных изменений в конфигурации данных белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время общеизвестно, что окислительный стресс является ключевым звеном в развитии многих нейродегенеративных процессов, в том числе гипоксии, приводящий, в конечном счете, к когнитивной дисфункции и развитию депрессивного состояния. Поэтому основная стратегия в предотвращении и лечении постинсультных состояний направлена на создание новых эффективных и безопасных способов повышения защитных свойств организма и остается актуальной задачей медико-биологических наук. В проделанной работе показано, что процессы изотопного замещения дейтерия на протий в тканях головного мозга приводят к повышению резистентности организма в условиях гипоксии. Поэтому направленный изотопный обмен в тканях организма, вызванный потреблением ОДВ, может рассматриваться как потенциальное антигипоксическое средство, которое может использоваться в совокупности с уже применяющейся терапией. Проведенные эксперименты показали следующее. На фоне развития патологии происходит развитие свободнорадикальных процессов, выражающееся возрастанием светосуммы хемилюминесценции и увеличением продуктов перекисного окисления липидов, способных взаимодействовать с ТБК. Активность ферментов 1 линии антиоксидантной системы, таких как каталаза и СОД, а также работа ферментов глутатионовой системы нарушалась на фоне смоделированной гипоксии. Уровень восстановленного глутатиона у гипоксированных животных

был достоверно ниже контрольных значений. Введение в рацион животным в течение 6 недель воды с пониженным содержанием дейтерия уменьшало последствия гипоксического стресса, выражающееся в повышении антиоксидантного статуса и снижении развития окислительного стресса. Работа таких ферментов как каталаза, СОД и ГП в этой группе животных была нарушена, но значения их активности были приближены к контрольным показателям. При этом у животных, которые получали ОДВ в течение шести недель, течение свободнорадикальных процессов и антиоксидантный статус в тканях головного мозга было на уровне контрольных значений.

Гипоксированные животные, в рационе которых была вода с естественным содержанием дейтерия, в течение первых трёх дней эксперимента имели наибольшее количество ошибок и максимальное время выполнения условно - рефлекторной реакции в «Т-образном лабиринте». Предварительный шести недельный рацион ОДВ до гипоксии способствовал снижению времени принятия решения и количеству ошибок при выполнении условно - рефлекторной реакции в «Т-образном лабиринте», приближая эти значения к контрольным значениям. Длительное применение ОДВ в условиях нормоксии не приводило к развитию тревожного состояния и не повлияло на показатели рабочей памяти.

Проведенные исследования *in vitro* на культуре нейронов мозжечка показали, что непродолжительная инкубация нервной ткани в среде с пониженной концентрацией дейтерия оказывает умеренное цитотоксическое действие. Так, в среде с содержанием дейтерия 50 ppm, гибель нейронов мозжечка при глюкозной депривации и при температурном стрессе была достоверно выше, чем в среде с природным содержанием дейтерия. Также инкубация в среде с низкой концентрацией дейтерия способствовала снижению мембранного потенциала митохондрий, уменьшению продукции АФК и понижению ионов кальция в цитозоле нейронов мозжечка. В экспериментах на переживающих срезах гиппокампа было показано уменьшение электрической активности нейронов поля СА1. Полученные результаты исследования *in vitro*

показали, что среда с низкой концентрацией дейтерия оказывает умеренное стрессовое действие на культуру ткани мозжечка и срезы гиппокампа и согласуется с экспериментами *in vivo*, согласно которым двухнедельный рацион ОДВ приводил к развитию окислительного стресса в тканях головного мозга крыс.

Снижение содержания дейтерия в реакционной среде приводит к уменьшению активности пероксидазной реакции окисления α -дианизидина и люминола пероксидом водорода в двух модельных системах. При этом спектры кругового дихроизма не изменяются при помещении ПХ и БСА в среду с измененным изотопным составом, а интенсивность собственной флуоресценции обоих белков уменьшается. По результатам оптических измерений можно предположить, что локальные замещения дейтерия на протий затрагивают поверхность белка, не вызывая при этом заметных изменений в конфигурации данных белков.

Любое изменение постоянства состава внутренней среды организма может привести к развитию стресса и включению адаптационных механизмов. На наш взгляд изменение концентрации дейтерия в крови и тканях животных, на начальном этапе потребления ОДВ, приводило к развитию умеренной стрессовой реакции в организме. Экспериментально на модельных системах, было показано, что изменение соотношения D/H в среде вызывало изменение активности фермента ПХ в модельных системах и локальные изменения структуры ПХ и БСА. Так же на экспериментах *in vitro* показало, что среда с концентрацией дейтерия 50 ppm изменяла физико-химические параметры нервной ткани. Это выражалось снижением МПМ, уровня цитозольного кальция и уменьшению продукции АФК в культуре нейронов мозжечка и приводило снижению популяционной электрической активности нейронов гиппокампа, выражающееся снижением амплитуды спайка. К тому же среда с пониженным содержанием дейтерия оказывала умеренный стресс, усиливая действие внешних стрессовых реакций. Можно предположить, что изменение постоянства дейтерия в организме, вызванное его уменьшением, может

изменять активность энзимов во многих органеллах клетки, затрагивая, в том числе работу белков электрон – транспортной цепи митохондрий, что, в конечном счете, может привести к уменьшению синтеза макроэргических соединений. О данном факте может свидетельствовать полученные данные об уменьшении МПМ нейронов мозжечка и уменьшении электрической активности популяции нейронов гиппокампа. Вызванный дефицит энергетического потенциала клетки может привести к разбалансировке ферментов АОЗ, активации окислительного стресса и дисфункции органов целостного организма.

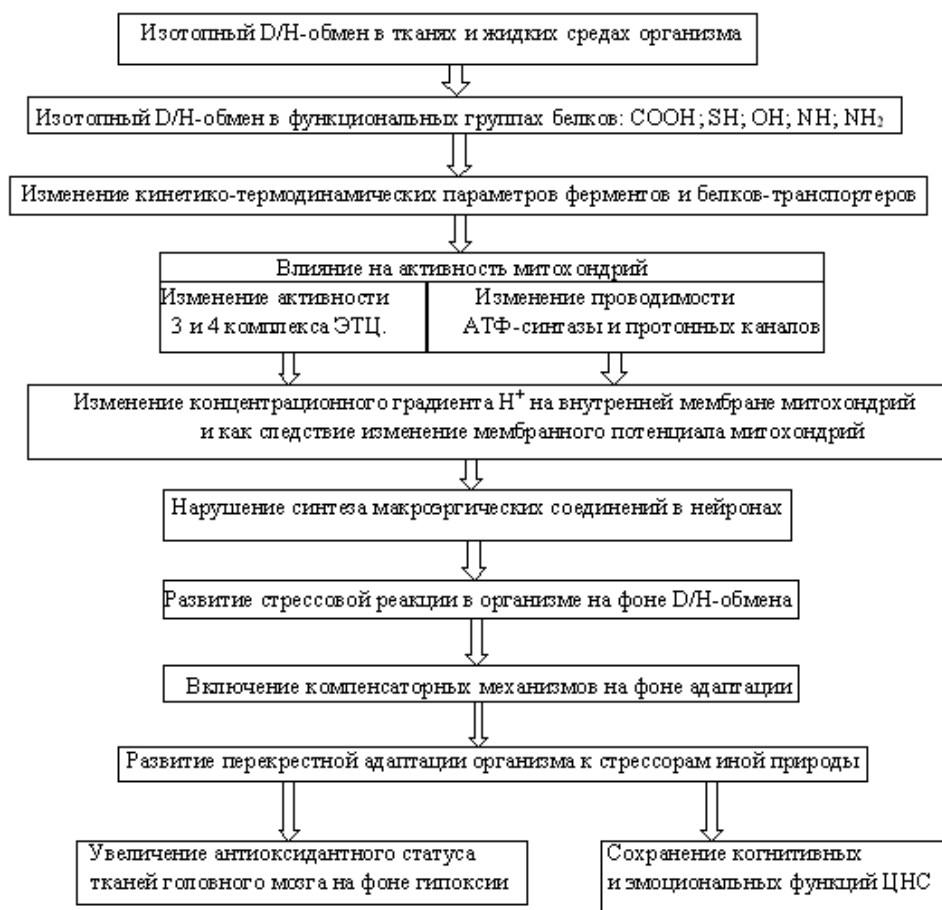


Рисунок 17 – Схема возможного механизма влияния низких концентраций дейтерия, вызванный D/H- обменом в тканях и крови животных

Длительное воздействие ОДВ нормализует работу ферментов АОЗ, восстанавливая тем самым редокс потенциал нейронов. Данный эффект может

быть обусловлен усилением клеточных и гуморальных защитных систем на фоне адаптации к изменению соотношения дейтерия к протию в организме крыс. В результате этого явления происходит активация различных процессов, приводящих к увеличению общей резистентности организма. В результате такого адаптивного эффекта происходит мобилизация энергетических и структурных ресурсов, активация факторов транскрипции и, как следствие, увеличение синтеза ряда защитных белков и ферментов (ферменты АОЗ и белки теплового шока), изменения активности рецепторов и ионных каналов, увеличение синтеза вторичных мессенджеров. Возможный механизм влияния низких концентраций дейтерия на организм млекопитающих представлен на рисунке 17.

ВЫВОДЫ

1. Вызванное изменение изотопного D/H состава внутренней среды организма, на фоне продолжительного применения (6 недель) обедненной дейтерием (50 ppm) воды, способствует антиоксидантному эффекту в тканях головного мозга, а также умеренному антиамнестическому эффекту после перенесенной острой гипоксии и умеренно анксиолитическому на фоне нормоксии.
2. Изменение изотопного D/H состава внутренней среды организма, на фоне непродолжительного применения (2 недели) обедненной дейтерием (50 ppm) воды, способствует прооксидантному эффекту в тканях головного мозга как в норме, так и после перенесенной острой гипоксии.
3. Инкубация нейронов мозжечка в среде с концентрацией дейтерия 50 ppm обуславливает стрессовое действие и вызывает умеренную цитотоксичность на фоне внешних стрессовых факторов. Гибель нейронов в среде с природным содержанием дейтерия на фоне глюкозной депривации и без нее была на 18% и 9% ниже, чем в среде с пониженным содержанием дейтерия.
4. Инкубация в среде с концентрацией дейтерия 50 ppm оказывает достоверное влияние на физико-химические параметры нервной ткани:
 - а) снижение мембранного потенциала митохондрий мозжечка в среднем на 5 %;
 - б) понижение ионов Ca^{2+} в цитозоле нейронов мозжечка в среднем на 15 %;
 - в) снижение продукции активных форм кислорода в нейронах мозжечка при увеличении метаболической нагрузки;
 - г) снижение амплитуды популяционного спайка в нейронах гиппокампа на 20 %.
5. Уменьшение концентрации дейтерия в реакционной среде приводит к уменьшению скорости пероксидазного окисления о - дианизидина и люминола пероксидом водорода в модельных системах. Константа Михаэлиса пероксидазной реакции окисления о-дианизидина пероксидом водорода, рассчитанная в координатах Лайнуивера-Берка и Иди-Хофсти, для среды с

концентрацией дейтерия 150 ppm составила 0,026 и 0,035 мМ, а для среды 50 ppm 0,033 и 0,042 мМ.

6. Уменьшение концентрации дейтерия в среде со 150 до 50 ppm не вызывает конформационных изменений вблизи активного центра пероксидазы хрена и не оказывает влияния на триптофановое и тирозиновое окружение в структуре фермента и бычьего сывороточного альбумина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова Ж. И. Человек и противоокислительные вещества / Ж. И. Абрамова, Г. И. Оксенгендлер. – Л.: Наука, 1985. – 230 С.
2. Абросимова А. Н. Влияние “легкой воды” на развитие помутнения хрусталика у мышей после многократного гамма – облучения в низких дозах / А. Н. Абросимова, Д. В. Раков, Ю. Е. Синяк // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2009. – Т. 43. – № 2 – С. 29 – 32.
3. Андреева Е. А. Влияние воды различного изотопного состава на пролиферативную активность эндотелиальных клетки *in vitro* / Е. А. Андреева, Н. А. Константинова, Л. Б. Буравкова, Ю. Е. Синяк // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2005. – Т.39. – №3 – С.46 – 52.
4. Баранова, К. А. Дистантное ишемическое кондиционирование мозга: феномены и механизмы / К. А. Баранова // Нейрохимия. – 2017. – Т. 34. – № 3. – С. 183-188.
5. Барышева Е.В. Изменение показателей прооксидантно/антиоксидантной системы при снижении концентрации дейтерия в организме лабораторных животных с аллоксановым диабетом / Е.В. Барышева // Фундаментальные исследования. – 2015. – №1–3 – С. 457 – 461.
6. Брюханов А.Л. Каталаза и супероксиддисмутаза: распределение, свойства и физиологическая роль в клетках строгих анаэробов / А.Л. Брюханов, А.И. Нетрусов // Биохимия. – 2004. – Т.69. – № 3. – С. 1170–1186.
7. Буреш Ян. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Ян Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон. – М.: Высш. школа, 1991. – 399 С.
8. Бурчинський С. Г. Ишемия головного мозга: возможности комплексной фармакологической коррекции / С. Г. Бурчинський // Украинский вестник психоневрологии. – 2006. – Т.1. – №14. – С. 15 – 18.
9. Ветровой О.В. Церебральные механизмы гипоксического/ишемического посткондиционирования / О.В. Ветровой, Е.А. Рыбникова, М.О. Самойлов // Биохимия. 2017. – № 3. – С.542–551.
10. Викторов И.В. Методы культивирования. Руководство по культивированию нервной ткани/ И.В. Викторов, В.Е. Шунгская М.: Наука, 1988. – 317 С.
11. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция/ Ю.А. Владимиров, Е. В. Проскурина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т.49. – С. 341–388.

12. Ворожцова С. В. Модификация водой с пониженным содержанием дейтерия и тяжелых изотопов кислорода цитогенетических эффектов облучения / С. В. Ворожцова, А. Н.А. бросимова, Е. И. Куликов, О.В. Дорожкина, М. А. Коваленко, Д. М. Крючкова, Ю. С. Северюхин, В. Н.Гаевский, Ю. Е. Синяк, А. А. Иванов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2014. – Т. 54. – № 1. – С. 21–26.
13. Воронина Т. А. Роль гипоксии в развитии инсульта и судорожных состояний. Антигипоксанты / Т. А. Воронина // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2016. – Т. 14. – № 1. – С. 63–79.
14. Гаврилов В.Б. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой / В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, Л.М. Мажуль // Вопросы медицинской химии. – 1987. – Т.33. – №1. – С.118–122.
15. Газарян И. Г. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений / И. Г. Газарян, Д. М. Хушпульян, В. И. Тишков //Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 303–322.
16. Галкина О. В. Особенности свободнорадиальных процессов и антиоксидантной защиты взрослого мозга / О. В. Галкина //Нейрохимия. – 2013. – Т.30. – №2. – С.93 – 102.
17. Генрихс Е.Е. Ионы меди потенцируют снижение мембранного потенциала митохондрий культивированных зернистых нейронов мозжечка при глюкозной депривации/ Е.Е. Генрихс, Е.В. Стельмашук, В.Б. Туровецкий // Нейрохимия. – 2017. – Т. 34. – № 2. – С. 146–150.
18. Григоренко Д. Е. Особенности клеточного состава лимфоидной ткани селезенки мышей после длительного применения легкоизотопной воды и облучения / Д. Е. Григоренко // Морфология. – 2015. – Т.148. –№ 4. – С.19 –23.
19. Джимак С.С. Влияние воды со сниженным содержанием дейтерия на изотопный состав лиофилизированных тканей и морфофункциональные показатели организма у крыс из разных поколений / С.С. Джимак, М.Г. Барышев, А.А. Басов, А.А. Тимаков // Биофизика. – 2014. – Т.59. – № 4. – С. 749–756.
20. Джимак С. С. Коррекция метаболических процессов у крыс при хроническом эндотоксикозе с помощью реакций изотопного (D/H) обмена / С. С. Джимак, А. А. Басов, Л. В. Федулова, А. С. Дыдыкин, И. М. Быков, О. М. Арцыбашева, Г. Н. Наумов, М. Г. Барышев // Известия РАН. Серия биологическая. – 2015. – № 5. – С. 518–527.

21. Дубинина Е. Е. Сравнительный анализ активности супероксиддисмутазы и каталазы эритроцитов и цельной крови у новорожденных детей при хронической гипоксии / Е. Е. Дубинина, Л.Ф. Ефимов, Л. И. Сафронова, А. Л. Геронимус // Лабораторное дело. – 1988. – №8. – С.10–19.
22. Дубинина Е.Е. Показатели окислительного стресса при нейродегенеративных заболеваниях (сосудистая деменция, болезнь Альцгеймера) / Е.Е. Дубинина, С.В. Ковругина, П.В. Коновалов // Успехи геронтологии. – 2007. – Т. 20. – С.109–113.
23. Дюжикова Н.А. Эпигенетические механизмы формирования постстрессорных состояний / Н.А. Дюжикова, Е. Б. Скоморохова, А. И. Вайдо // Успехи физиологических наук. – 2015. – Т.64. – №1. – С. 47 – 75.
24. Дюжикова Н.А. Геном и стресс–реакция у животных и человека / Н.А. Дюжикова, Е.В. Даев // Экологическая генетика. – 2018. – Т. 16. – №1. – С. 4 – 26.
25. Завалий Л.Б. Метаболическая терапия при ишемическом инсульте / Л.Б. Завалий, С.С. Петриков, А.В. Щеголев // Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь». – 2018. – Т. 7. – №1. – С.44–52.
26. Заводник И.Б. Митохондрии, кальциевый гомеостаз и кальциевая сигнализация / И.Б. Заводник // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 62. – № 3. – С. 311–317.
27. Зозуля Ю.А., Барабой В.А., Сутковой Д.А. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга / Ю.А. Зозуля, В.А. Барабой, Д.А. Сутковой. – М.: Знание. – 2000. – 344 С.
28. Иванов А. А. Легкоизотопная вода – средство лечения лучевой болезни / А. А. Иванов, И. Б. Ушаков, Е. И. Куликова, Д. М. Крючкова, Е. С. Северюхин, С. В. Ворожцова, А. Н. Абросимова, В. А. Гаевский, Ю. Е. Синяк, А. И. Григорьева // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2013. – Т.47. – № 5. – С. 40 – 44.
29. Игнатов И. Изотопный состав воды и ее температура в процессе эволюционного происхождения жизни и живой материи / И. Игнатов, О. В. Мосин // Наукоедение. – 2013. – Т. 14. – №1. – С. 1–16.
30. Измайлов Д. Ю. Действие антиоксидантов на образование свободных радикалов – первичных продуктов пероксидазной реакции / Д.Ю.

- Измайлов, Е.В. Проскурнина, Е.В. Шишканов, Г.А. Владимирова, Ю.А. Владимиров //Биофизика. – 2017. – Т. 62. – № 4. – С. 686–694.
31. Исаев Н.К. Глюкозная депривация стимулирует продукцию свободных радикалов в митохондриях культивируемых зернистых нейронов мозжечка / Н.К. Исаев, Е.В. Стельмашук, У. Дирнагл // Биохимия. – 2008. – Т. 73. –№ 2. – С. 185–192.
32. Исаев Н.К. Роль ацидоза, NMDA–подтипа глутаматных рецепторов и кислочувствительных ионных каналов (ASIC1A) в развитии нейрональной гибели при ишемии/ Н.К. Исаев, Е.В. Стельмашук, Е.Ю. Плотников, Т.Г. Хряпенкова, Е.Р. Лозиер, Ю.В. Долудин, Д.Н. Силачев, Д.Б. Зоров //Биохимия. – 2008. – Т.73. –№11. – С. 1461–1466.
33. Калинина Е.В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс–зависимых процессов / Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов // Успехи.биол.хим. – 2014. –Т.54. – С. 299–348.
34. Карпова И.В. Влияние острой гипоксии с гиперкапнией на содержание моноаминов в симметричных структурах головного мозга самцов мышей линии BALB/C. / И.В. Карпова, В.В. Михеев, В.В. Марышева, Е.Р. Бычков, П.Д. Шабанов //Биомедицинская химия. – 2014. – Т.60. – №2. – С.258–263.
35. Киркина А.А. Изотопные эффекты малых концентраций дейтерия воды в биологических системах/ А.А. Киркина, В.И. Лобышев, О.Д. Лопина, Ю.К. Доронин, Т.Н. Бурдейная, А.С. Чернопятко // Биофизика. – 2014. – Т. 59. – № 2. – С. 399–407.
36. Колесниченко В.В. Изучение влияния высокой концентрации кадмия на функционирование антиоксидантных систем этиолированных проростков пшеницы разной длины / В.В. Колесниченко, А.В. Колесниченко // Journalof Stress Physiology and Biochemistry. – 2011. – V.7. – № 3. – P. 212–221.
37. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы/ М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лабораторное дело. – 1988. – №1. – С.16–19.
38. Кубасов Р. В. / Р. В. Кубасов //Гормональные изменения в ответ на экстремальны факторы внешней среды. Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014. – Т. 69. –№ 9–10. – С. 102–109.
39. Куликова Е. И. Радиомодифицирующие свойства воды с пониженным содержанием дейтерия и тяжелых изотопов кислорода / Е. И. Куликова, Д. М. Крючкова, Е. С. Северюхин, В. А. Гаевский, А. А. Иванов //

- Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2012. Т.46. –№ 6. – С. 45 – 50.
40. Кулинский В.И. Система глутатиона. II другие ферменты, тиол–дисульфидный обмен, воспаление и иммунитет, функции / В.И. Кулинский, Л. С. Колиснеченко // Биомедицинская химия. – 2009. – Т.55. –№ 4. – С. 365–379.
 41. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В.И. Кулинский // Соровский образовательный журнал. – 1999. – №1. – С.2–7.
 42. Курбаш М.Н. L-глутамат: современный взгляд на известную аминокислоту / М. Н. Курбаш // Нейрохимия. – 2009. – Т.26. –№3. – С. 202–207.
 43. Ландышев Ю.С. Механизмы действия и основные терапевтические эффекты глюкокортикоидов / Ю.С. Ландышев // Амурский медицинский журнал. – 2014. – Т.5. –№ 1. – С. 10–29.
 44. Лебедева О. В. Кинетическое изучение реакции окисления о–дианизидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена / О. В. Лебедева, Н. Н. Угарова, И. В. Березин //Биохимия. – 1977. – Т.42. – С.1372– 1379.
 45. Лещенко Д.В. Диетически индуцированные животные модели метаболического синдрома / Д.В. Лещенко, Н.В. Костюк, М.Б. Белякова, Е.Н. Егорова // Верхневолжский медицинский журнал. – 2015. – Т.14. – №2. – С. 34 – 39.
 46. Лобышева Н. В. Функциональная активность митохондрий в водной среде с уменьшенным содержанием дейтерия / Н. В. Лобышева, С. В. Нестеров, Ю. А. Скоробогатова, В. И. Лобышев // Биофизика. – 2020. – Т. 65. – № 2. – С. 315 – 319.
 47. Малышев И.Ю. Стресс, адаптация и оксид азота / И.Ю. Малышев, Е.В. Манухин //Биохимия. – 1998. – Т.63. – №7. – С.840–53.
 48. Меерсон Ф.З. Феномен адаптационной стабилизации структур и защиты сердца / Ф.З. Меерсон, И.Ю. Малышев. – М.: Наука. – 1993. – 157 С.
 49. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В.М. Моин // Лабораторное дело. – 1986. – №12. – С.724–729.
 50. Мосин О.В. Вода и ее структура / О.В. Мосин, И. Игнатов //Химия. – 2012. – № 11. – С. 24–27.

51. Мухачев В.М. “Живая” вода / В.М. Мухачев. – М.: Наука, 1975. – 143 С.
52. Бохан Н. А. Серотониновая система в модуляции депрессивного и аддиктивного поведения / Н. А. Бохан, С. А. Иванова, Л. А. Левчук. – Томск: Иван Федоров, 2013. – 102 С.
53. Назаров Н. М. Влияние легкоизотопной среды на рост бактериальной культуры / Н. М. Назаров, Ю. Е. Синяк, Е. Н. Ефременко, Н. А. Степанов, Е. Ю. Малых // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2011. – Т.45. – №3. – С.63 – 66.
54. Наточин Ю. В. Гомеостаз / Ю. В. Наточин //Успехи физиологических наук. – 2017. – Т. 48. –№ 4. – С. 3–15.
55. Незнанов Н.Г. Исследование параметров окислительного стресса при психических нарушениях в позднем возрасте (болезнь Альцгеймера, сосудистая деменция, депрессивное расстройство)/ Н.Г. Незнанов, Н.М. Залуцкая, Е.Е. Дубинина, Д.В. Захарченко, Л.В. Щедрина, Н.И. Ананьева, К.В. Ющин, Л.Г. Кубарская, С.Г. Дагаев, Я.Г. Трилис //Обзор психиатрии и медицинской психологии. – 2013. – № 4. – С.31 – 38.
56. Новиков В.Е., Дикманов В.В., Марышева В.В. Влияние нового производного триазиноиндола на функциональное состояние ЦНС животных в условиях нормоксии и гипоксии/ В.Е. Новиков, В.В. Дикманов, В.В. Марышева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – Т.75. – №9. – С.7–11.
57. Самойлов М.О. Особенности экспрессии про и антиапоптотических белков Вах и Всл-2 в нейронах мозга крыс в ответ на тяжелую гипобарическую гипоксию: корректирующий эффект гипоксического preconditionирования / М.О. Самойлов, Н.А Ситник, Е.А. Рыбникова, Т.С. Глущенко, Е.И. Тюлькова // Доклады АН. – 2005. – Т.402. –№4. – С. 1–3.
58. Пасевич Д. М. Молекулярно–генетические аспекты злокачественных новообразований толстой кишки / Д. М. Пасевич, С. А. Сушков, В. М. Семенов // Новости хирургии. – 2016. – Т. 24. –№ 2. – С. 184–192.
59. Першин С. М. Кратное увеличение производительности дрожжей при уменьшении доли D2O в воде / С. М. Першин, Э. Ш. Исмаилов, М. М. Дибирова, Э. М. Ахмедов, Ф. В. Тагирова, Д. И. Шашков, З. Н. Абдулмагомедова // Доклады Академии наук. – 2017. – Т.476. – №2. – С. 233 – 236.

60. Петрова Е.С. ГАМК–ергические нейроны стриатума крыс в норме и при ишемическом повреждении/ Е.С. Петрова, Т.Д. Власов, Е.А. Колос, Д.Э. Коржевский //Асимметрия. – 2013. – Т. 7. –№ 3. – С. 4–9.
61. Поварова О.В. Антиоксиданты как нейропротекторы при ишемическом инсульте / О.В. Поварова, Е.И. Каленикова, Е.И. Городецкая, О.С. Медведев // Экспер. и клин. фармакол. – 2003. – Т. 66. –№ 3. – С. 69–73.
62. Поляничко А. М. Межмолекулярные взаимодействия сывороточного альбумина в растворе / А. М. Поляничко, Н. В. Михайлов, Н.М. Романов, Ю. Г. Баранова, Е. В. Чихиржина // Цитология – 2016. – Т. 58. –№9. – С. 707–713.
63. Решетняк М.В. Модель метаболического синдрома, вызванная кормлением фруктозой: патогенетические взаимосвязи обменных нарушений / М.В. Решетняк, В.Н. Хирманов, Н.Н. Зыбина // Медицинский академический журнал. – 2011. – Т. 11. –№ 3. – С. 23–27
64. Рогожин В.В. Стационарная кинетика совместного пероксидазного окисления гидрохинона и о–дианизидина в присутствии пероксидазы хрена/ В.В. Рогожин, В.В. Верхотуров // Биохимия. – 1999. – Т. 64. – №2. – С. 219–224.
65. Рогожин В.В. Ингибирование пероксидазы N–этиламидом о–сульфобензоилуксусной кислоты / В.В. Рогожин, Г.Д. Кутузова, Н.Н. Угарова // Биоорганическая химия. – 2000. – Т. 26. –№ 2. – С. 156–160.
66. Рыбникова Е.А. Влияние гипобарической гипоксии на экспрессию белков ранних генов и структурные изменения нейронов мозга: корректирующий эффект прекондиционирования / Е.А. Рыбникова, Л.И. Хожай, Е.И. Тюлькова и др.// Морфология. – 2004. – Т. 125. –№2. – С. 10–15.
67. Самойлов М. О. Адаптивные эффекты гипоксического прекондиционирования нейронов мозга / М.О. Самойлов, Е.В. Лазаревич, Д.Г. Семенов и др.// Росс. физиол. ж. им. И.М.Сеченова. – 2001. –Т. 87. – С. 714–729.
68. Селье Г. Стресс без дистресса. / Ред. Е.М. Крепс. М.: Прогресс. 1979, 124 С.
69. Сергеев Д.В. Новые возможности нейропротекции при ишемическом инсульте / Д.В. Сергеев, М. А. Пирадов, М. Ю. Максимова, М. А. Домашенко, А. Н. Сергеева, Ф. Р. Охтова //Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2011. – № 4 – С.56 – 63.
70. Стельмашук Е.В. Влияние глутамина на гибель культивированных зернистых нейронов, индуцированную глюкозной депривацией и

- химической гипоксией/ Е.В. Стельмашук, С.В. Новикова, Н.К. Исаев // Биохимия. – 2010. – Т. 75. –№ 8. – С. 1150–1156.
71. Степаненко О.В. Роль четвертичной структуры в стабилизации флуоресцентных белков / О.В. Степаненко, В.В. Верхуша, М.М. Шавловский, Т.Д. Алейникова и др. // Цитология. – 2005. – Т. 47. –№ 11. – С. 1017–1020.
72. Строев С. А. Сравнение эффектов однократной и трехкратной умеренной гипобарической гипоксии на экспрессию Cu, Zn–супероксиддисмутазы в гиппокампе крыс / С. А. Строев, Е. И. Тюлькова, М. О. Самойлов, М. Т. Пелто Хьюкко // Нейрохимия, – 2012, –Т.29. –№ 3. – С. 1–6.
73. Титов Б.В. Ишемический инсульт как комплексное полигенное заболевание / Б.В. Титов, Н.А. Матвеева, М.Ю. Мартынов, О.О. Фаворова //Молекуляр. биол. – 2015. – Т. 49. – № 2. – С. 224–248.
74. Турусов В. С. Рост перевиваемых опухолей у мышей после предварительного введения им воды с пониженным содержание дейтерия / В. С. Турусов, Ю. Е. Синяк, Е. Е. Антошина, Л. С. Труханова, Т. Г. Горькова // Вопросы онкологии. – 2006. – Т.52. –№1. – С.59–62.
75. Турусов В. С. Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия на рост перевиваемых опухолей / В. С. Турусов, Ю. Е. Синяк, Е. Е. Антошина, Л. С. Труханова, Т. Г. Горькова // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – т.3. №2. –С.37
76. Фархутдинов Р.Р. Хемилюминесцентные методы исследования свободно–радикального окисления в биологии и медицине / Р.Р. Фархутдинов, В.А. Лиховских. – Уфа. – 1995. –92 С.
77. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии/ Ю.Б.Филиппович, Т.А. Егорова, Г.А. Севастьянова. М.: Просвещение. – 1982. – 311 С.
78. Хвостунов И.К. Анализ хромосомных aberrаций в клетках млекопитающих при воздействии различных видов ионизирующего излучения / И.К. Хвостунов, В.С. Пятенко, Н.Н. Шепель и др. // Радиация и риск. – 2013. – Т. 22. –№ 4. – С. 43 – 59.
79. Цейликман В.Э. Глюкокортикоидзависимая регуляция ПОЛ в коре головного мозга при анксиогенном стрессе / В.Э. Цейликман, А.И. Сеницкий, О.Б. Цейликман и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т.159. –№ 6. – С. 701–703.

80. Шурыгина Л. В., Злищева Э. И., Кравцова А. Н., Кравцов А. А. Антиоксидантный и антиамнестический эффект комената калия и коеновой кислоты в условиях нормобарической гипоксии с гиперкапнией / Л. В. Шурыгина, Э. И. Злищева, А. Н. Кравцова, А. А. Кравцов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т.163. – №3. – С.325–330.
81. Шустов Е. Б. Поиск закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений с ноотропным и нейропротекторным действием/ Е. Б. Шустов, В.Н. Каркищенко, Х. Х. Семенов и др.//Биомедицина. –2015. – №1. – С.18–23.
82. Южаков В. В. Эффективность фракционированного воздействия γ – излучения и быстрых нейтронов на саркому М-1/ В. В. Южаков, Л. Е. Севаньякаева, С. Е. Ульяненко и др.// Радиационная биология. Радиоэкология. – 2013. – Т.53. – №3. – С. 267 – 279.
83. Юсупова Л.Б. О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов/ Л.Б. Юсупова //Лабораторное дело. – 1989. – №4. – С. 19–21.
84. Яглова Н. В. Реакция гипофизарно-тиреоидной оси на кратковременное изменение содержания дейтерия в организме / Н. В. Яглова, С. С. Обернихин, Е. П. Тимохина, В. В. Яглов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 171. – № 2. – С. 232-234.
85. Яглова Н. В. Влияние уменьшения поступления дейтерия в организм на процессы терморегуляции / Н. В. Яглова, С. С. Обернихин, Е. П. Тимохина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 171. – № 5. – С. 538-542.
86. Adler V. Regulation of JNK signaling by GSTp / V. Adler, Z. Yin, S.Y. Fuchs et al // EMBO J. – 1999. –V.18. – P. 1321–1334.
87. Aguilera G. Negative regulation of corticotropin releasing factor expression and limitation of stress response / G. Aguilera, A. Kiss, Y. Liu, A. Kamitakahara // Stress. – 2007. – V.10. – №2. – P. 153–161.
88. Allocati N. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases / N. Allocati, M. Masulli, C. Di Ilio et al // Oncogenesis. – 2018. – V. 7. – №1. – P.8–15.
89. Almoguera C. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes / C. Almoguera, D. Shibata, K. Forrester et al. //Cell. – 1988. – V.53. – №4. – P. 549–54.

90. Anderson S. R. Developmental roles of microglia: a window into mechanisms of disease / S.R. Anderson, M. L. Vetter // *Developmental Dynamic*. – 2019. – V.248. – №1. – P. 98–117.
91. Andrews P. No effect of high sucrose diets on the kidneys of Wister Kyoto (WKY) rats/ P. Andrews, P.A. Karadaghi, S. Memon et al. // *Geriatric Nephrology and Urology*. – 1992. – V. 2. – № 1. – P. 35–42.
92. Ashley McDonough. Ischemia/Reperfusion Induces Interferon–Stimulated Gene Expression in Microglia/ McDonough A., Lee R. V., Shahani N. et al // *Weinstein J Neurosci*. – 2017. – V.37. – №34. – P.8292–8308.
93. Askari A. The sodium pump and digitalis drugs: Dogmas and fallacies/ A. Askari // *Pharmacol Res Perspect*. – 2019. – V.7. – №4.
94. Bai J.J. Secretin at the hub of water–salt homeostasis/ J.J. Bai, C.D. Tan, B.K. Chow // *J. Physiol. Renal Physiol*. – 2017. – V. 312. – № 5. – P. 852–860.
95. Banning A. NF–kappaB, Nrf2 and HO–1 interplay in redoxregulated VCAM–1 expression / A. Banning, R. Brigelius–Flohé // *Antioxid. Redox Signal*. – 2005. – V.7. – P.889 – 899.
96. Baryshev M. G. NMR, EPR, and Mass Spectroscopy Estimates of the Antiradical Activity of Water with Modified Isotope Composition / M. G. Baryshev, A. A. Basov, S. N. Bolotin et al // *Bulletin of the Russian Academy of Sciences. Physics*. – 2012. – V. 76. – №12. – P. 1349 –1352.
97. Basov A. A. Deuterium-Depleted Water Influence on the Isotope 2H/1H Regulation in Body and Individual Adaptation / A. A. Basov, L. Fedulova, M. Baryshev, S. Dzhimak // *Nutrients*. – 2019. – V.11. – №8.
98. Benveniste H. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis/ H. Benveniste, J. Drejer, A. Schousboe, N.H. Diemer // *Weinstein J. Neurochemical*. – 1984. – V.43. – №5. – P.1369–1374.
99. Berglund G.I. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution / G.I. Berglund, G.H. Carlsson, A.T. Smith et al // *Nature*. – 2002. – V.417. – P.463–468.
100. Berndt C. Glutathione, Glutaredoxins, and Iron/ C. Berndt, C.H. Lillig // *Antioxid Redox Signal*. – 2017. – V.27. – №15. – P.1235–1251.
101. Block, F. Dextromethorphan reduces functional deficits and neuronal damage after global ischemia in rats/ F. Block, M. Schwarz // *Brain Res*. – 1996. – V.741. – P.153–159.

102. Borders C.L. Identification of ARG-143 as the essential arginyl residue in yeast Cu,Zn superoxide dismutase by use of a chromophoric arginine reagent / C.L. Borders, J.T.Johansen // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1980. – V.96. – №3. – P.1071–1078.
103. Boros L. G. Submolecular regulation of cell transformation by deuterium depleting water exchange reactions in the tricarboxylic acid substrate cycle / L.G. Boros, D.P. D'Agostino, H.E. Katz, J.P. et al // *Medical hypotheses.* – 2016.- V. 87. -P. 69-74.
104. Brigelius-Flohé R. Glutathione peroxidases / R. Brigelius-Flohé, M. Maiorino // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – V.1830. – P.3289–3303.
105. Brigelius-Flohé R. Interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation is inhibited by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line. / R. brigelius-Flohé, B. Friedrichs, S. Maurer // *Biochem. J.* – 1997. – V.328. – №1. – P.199–203.
106. Brown H.A. Working towards an exegesis for lipids in biology / H.A. Brown, R.C. Murphy // *Nat Chem Biol.* – 2009. – V. 5. – №9. –P.602–610
107. Cannon W.B. Organization for physiological homeostasis / W.B. Cannon // *Physiol. Rev.* – 1929. –V9. – P. 399–431.
108. Chang K.C. Aminoguanidine prevents fructose-induced deterioration in left ventricular arterial coupling in Wistar rats/ K.C. Chang, J.T. Liang, C.D. Tseng et al. // *British Journal of Pharmacology.* – 2007. – V. 151. – № 3. – P. 341–346.
109. Chang L.Y. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes/ L.Y. Chang, J.W. Slot, H.J. Geuze, J.D. Crapo // *J Cell Biol.*– 1988. – V.107. – №6. – P.2169–79
110. Chernobrovkin Alexey, Consuelo Marin-Vicente, Neus Visa, Zubarev Roman A. Functional Identification of Target by Expression Proteomics (FITExp) reveals protein targets and highlights mechanisms of action of small molecule drugs // *Scientific Reports.* – 2015. – V.5. – P. 111 – 176.
111. Choi D.W., Maulucci-Gedde M., Kriegstein A.R. Glutamate neurotoxicity in cortical cellculture / D.W. Choi, M. Maulucci-Gedde, A.R. Kriegstein // *The Journal of Neuroscience.* – 1987. – V.7. – № 2. – P. 357–368.
112. Chong Z.Z. Oxidative stress in the brain novel cellular targets that govern survival daring neurodegenerative disease/ D.W. Choi, M. Maulucci-Gedde, A.R. Kriegstein // *Progr. Neurobiol.* – 2005. – V. 75. – P. 207–246.
113. Chu F.F., Doroshov J.H., Esworthy R.S. Expression characterization, and tissue-distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione

- peroxidase, GSHPx-GI / F.F. Chu, J.H. Doroshov, R.S. Esworthy // *J Biol Chem.* – 1993. – V.268. – P. 2571–2576.
114. Davies M. Dithiolthione–induced alterations in hepatic glutathione and related enzymes in male mice/ M. Davies, A. Blacker, R. Achnell // *Biochem. Pharmacol.* – 1987. – V. 36. – №4. – P. 568–570.
 115. Dear T.N, Campbel K., Rabbitt T.H. Molecular cloning of putative odorant–binding and odorant–metabolizing proteins / T.N. Dear, K. Campbel, T.H. Rabbitt // *Biochemistry.* – 1991. – V. 30. – № 43. – P. 10376–10382.
 116. Diane M. O’Brien Tracking human travel using stable oxygen and hydrogen isotope analyses of hair and urine / Diane M. O’Brien, Matthew J. Wooller // *Rapid communication in Mass Spectrometry.* – 2007. – V.21. – P. 2422.
 117. Dikstein S. Metabolically regulated cyclical contractures in microinjected *Spirostomum*: a pharmacological study/ S. Dikstein, R.B. Hawkes // *Experientia.* – 1976 – V. 32. – №.8. – P.1029–1031.
 118. Dohnal V., Wu Q., Kuca K. Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences / V. Dohnal, Q. Wu, K. Kuca // *Arch. Toxicol.* – 2014. – V.88. – P.1635–1644.
 119. Drevet J.R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story / J.R. Drevet // *Mol Cell Endocrinol.* – 2006. – V. 250. – P.70–79.
 120. Dringen R. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species / R. Dringen, J.M. Gutterer, J. Hirrlinger // *Eur J Biochem.* – 2000. – V.267, №16. – P.4912–4916.
 121. Dringen R. Methabolism and functione of glutathione in brain / R. Dringen // *Prog. in Neurobiol.* – 2000. – V. 62 – P.649–671.
 122. Dzhimak S.S. Application of NMR spectroscopy to the determination of low concentrations of nonradioactive isotopes in liquid media / S.S. Dzhimak, A.A. Basov, G.F. Kopytov et al // *Russian Physics Journal.* – 2015. – V. 58. – №7. – P. 923–929.
 123. Dzhimak S.S. Mathematical Modeling of Open States in DNA Molecule Depending on the Deuterium Concentration in the Surrounding Liquid Media at Different Values of Hydrogen Bond Disruption Energy / S.S. Dzhimak, M.I. Drobotenko, A.A. Basov et al // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2018. – V.483. – P. 359–362.
 124. Esworthy R.S., Binder S.W., Doroshov J.H., Chu F.F. Microflora trigger colitis in mice deficient in selenium–dependent glutathione peroxidase and

- induce Gpx2 gene expression / R.S. Esworthy, S.W. Binder, J.H. Doroshow, F.F. Chu // *Biol. Chem.* – 2003. – V.384. – P. 597–607.
125. Fanali G. Human serum albumin: from bench to bedside / G. Fanali, di Masi, V. Trezza et al // *Mol. Asp. Med.* – 2012. – V.33. – N 3. – P. 209–290.
 126. Feng–Song C., Ya–Ru Zh., Hong–Cai Sh., Zong–Hua A., Su–Yi Zh., Ju–Yong W. Deuterium–depleted water inhibits human lung carcinoma cell growth by apoptosis / C. Feng–Song, Zh. Ya–Ru, Sh. Hong–Cai et al//*Experimental and Therapeutic Medicine.* – 2010. – V.1. – №2. –P. 277–283.
 127. Filaretova L. The Realization of the Brain–Gut interactions with corticotropin–releasing factor and glucocorticoids/ L. Filaretova, T. Bagaeva // *Curr. Neuropharmacol.* – 2016. – V.14. –№ 8. – P. 876–881.
 128. Filipović, D. Differential regulation of Cu,Zn–SOD expression in rat brain by acuteand/or chronic stress / D. Filipović, S.B. Pajović // *Cell Mol. Neurobiol.* – 2009. –Vol. 29. – № 5. – P. 673–681.
 129. Fish D.The risk of radiation exposure to the eyes of the interventional pain physician / D. Fish, A. Kim, C. Ornelas et al. // *Radiol Res Pract.* – 2011. – V.– 2011.
 130. Flohé L. The selenoprotein glutathioneperoxidase /L. Flohé// *Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects.* – 1989. – V. 3. – P. 643–731.
 131. Fricker M. Neuronal Cell Death / M. Fricker, M. Tolkovsky, V. Borutaite et al // *Physiol Rev.* – 2018 . –V. 98. – №2. – P. 813–880.
 132. Fridovich I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters / I. Fridovich//*J. Biol.Chem.* – 1997. – V.272. –№30. – P.18515–18517.
 133. Fukai T. Superoxide dismutases: role in redox signaling,vascular function, and diseases/ T. Fukai, M. Ushio–Fukai // *Antioxid. Redox Signal.* – 2011. – V. 15. – P.1583–1606
 134. Gajda A.M. DietInduced Metabolic Syndrome in Rodent Models animal/A.M.Gajda, M.A. Pellizzon, M.R. Ricci, E.A. Ulman // *LABNEWS.* – 2007. – V.74. – P.775 – 793.
 135. Garbarino V. R. Mechanisms of Oxidative Stress Resistance in The Brain: Lessons Learned from Hypoxia Tolerant Extremophilic Vertebrates / V. R. Garbarino, M. E. Orr et al// *Arch Biochem Biophys.* – 2015. – V. 576. – P.8–16.
 136. Ghyselinck N.B. Androgen-dependent messenger RNA(S) related to secretory proteins in the mouse epididymis / N.B. Ghyselinck, C. Jimenez, Y. Courty, J.P.Androgen-dependent messenger RNA(S) related to secretory

- proteins in the mouse epididymis// *J Reprod Fertil.* – 1989. – V. – 85. – P. 631–639.
137. Gong G. Differential effects of selenium and knock-down of glutathione peroxidases on TNFalpha and flagellin inflammatory responses in gut epithelial cells/ G. Gong, C. Méplan, H. Gautrey et al// *Genes Nutr.* – 2012. – V.7. – P.167–178.
 138. Gutteridge J.M. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins / J.M. Gutteridge // *Biochim Biophys Acta.* –1993. –V.1156. – №2. – P.144–150.
 139. Gyöngyi Z. Deuterium depleted water effects on survival of lung cancer patients and expression of Kras, Bcl2, and Myc genes in mouse lung/ Z. Gyöngyi, F. Budán, I. Szabó et al// *Nutr Cancer.* – 2013. – V.65. – №2. – P.240–246.
 140. H. Cha–Molstad p62/SQSTM1/Sequestosome–1 is an N–recognin of the N–end rule pathway which modulates autophagosome biogenesis/ H.Cha–Molstad, J. Yu, Z. Feng et al // *Nat Commun.* – 2017. –V.8. – №1.
 141. Hart P.J. Pathogenic superoxide dismutase structure, folding, aggregation and turnover / P.J. Hart // *Curr. Opin. Chem. Biol.* –2006. – V.10. – №2. – P.131–138.
 142. Hartz J. W. Preparation and physicochemical properties of humannerythrocyte hemoglobin/ J. W. Hartz, H. F. Deutsch // *The J. of Biol.Chem.* – 1969. – V.244. – N 17. – P. 4565–4572.
 143. Hayes J.D. Glutathione transferases/ J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R.Jowsey // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2005. – V.45. – №4. – P.51–88.
 144. Hayes J.D. Expression of glyoxalase,glutathion peroxidase and glutathion s – transferase isoenzymes in different bovine tissues / J.D. Hayes, S.W. Milner , S.W. Walker // *Biochim Biphys Acta.* – 1989. –V.994. – P.21 – 29.
 145. Henriksen A. The Structures of the Horseradish Peroxidase C–Ferulic Acid Complex and the Ternary Complex with Cyanide Suggest How Peroxidases Oxidize Small Phenolic Substrates / A. Henriksen, A. T. Smith, M. Gajhede // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V .274. –№ 49 – P.35005–11
 146. Herbette S. Seleno–independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers /S. Herbette, P. Roedel - Drevet, J.R. Drevet // *FEBS J.*– 2007. V.274. – №9. – P.2163–80.
 147. Ho Y.S. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia / Y.S. Ho, J.L. Magnenat, R.T. Bronson et al // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 16644–16651.

148. Howells R.E. Association between glutathione-S-transferase GSTP1 genotypes, GSTP1 over-expression, and outcome in epithelial ovarian cancer / R.E. Howells, K.K. Dhar, P.R. Hoban et al//Int J Gynecol Cancer. – 2004. –V.14. – P. 242–250.
149. Jaeschke H. Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress/ H. Jaeschke, Y.S. Ho, M.A. Fisher //Hepatology. – 1999. – V.29. – P.443–450.
150. Kalaria Raj N. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia / Raj N. Kalaria, R. Akinyemi, M. Ihara // Biochim Biophys Acta. – 2016. – V.1862. – №5. – 915–925.
151. Kalogeris T. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning/ T. Kalogeris, Y. Bao, R.J. Korthuis // Redox Biol.– 2014. – V.2. – №2. – P.702–14.
152. Kira Y. Association of Cu,Zn-type superoxide dismutase with mitochondria and peroxisomes / Y. Kira, E.F. Sato, M. Inoue //Arch Biochem Biophys. – 2002. – V.399. – №1. – P.96–102.
153. Kodydková J. Human Catalase, Its Polymorphisms, Regulation and Changes of Its Activity in Different Diseases / J. Kodydková, L. Vávrová et al// Folia Biologica (Praha). – 2014. – V.60. – P. 153–167.
154. Koeberle S. C. Distinct and overlapping functions of glutathione peroxidases 1 and 2 in limiting NF- κ B-driven inflammation through redox-active mechanisms / S. C. Koeberle, A. Gollowitzer et al // Redox Biol. – 2020 – V. 28
155. Kondratenko R.V. Comenic acid prevents post-stress enhancement of long-term potentiation in rat hippocampus / R.V. Kondratenko, A.N. Chepkova et al//Bulletin of Experimental Biology and Medicine. –2003. – V. 136. – № 5. – P. 464–466.
156. Kovocs A. Deuterium depletion may delay the progression of prostate cancer/ A. Kovocs, I. Guller, K. Krempels et al//J Cancer Therapy. – 2011. – V.2. – P.548–556.
157. Krempels K. A Retrospective evaluation of the effects of deuterium depleted water consumption on 4 patients with brain metastases from lung cancer / K. Krempels, I. Somlyai, G. Somlyai // Integrative Cancer Therapies. – 2008. – V.7. – №3. – P. 172–181.
158. Krempels K. retrospective study of survival in breast cancer patients undergoing deuterium depletion in addition to conventional therapies /

- K. Krempels, I. Somlyai, Z. Gyöngyi et al // J Cancer Res Ther. – 2013. – V.1. – №8. – P.194–200.
159. Kretz–Remy C. Inhibition of I kappa B–alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF–kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression / C. Kretz–Remy, P. Mehlen et al //J. Cell Biol. – 1996. – V.133. – P.1083–1093.
160. Kwon H.M. Homocysteine as a predictor of early neurological deterioration in acute ischemic stroke / H.M. Kwon, Y.S. Lee et al //Stroke. – 2014. – V.45. – №3. – P.871–873.
161. Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death / E. Laborde //Cell. Death Differ. – 2010. – V.17. – P.1373–1380.
162. Lee W. Y. Uwhangchungsimwon, a traditional herbal medicine, protects brain againstoxidative injury via modulation of hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) response in achronic restraint mice model / W. Y. Lee, S. W. Jang, J. S. Lee et al // J Ethnopharmacol. – 2014. – V.151. – №1. – P.461–469
163. Lien S. The polymorphic human glutathione transferase T1–1, the most efficient glutathione transferase in the denitrosation and inactivation of the anticancer drug 1,3–bis(2–chloroethyl)–1– nitrosourea / S. Lien, A.K. Larsson, B. Mannervik //Biochem Pharmacol. – 2002. – V.63. – P.191–197.
164. Lin Y.S. GST M1 polymorphism associates with DNA oxidative damage and mortality among hemodialysis patients / Y.S. Lin, S.C. Hung et al //J Am Soc Nephrol. – 2009. – V.20. – №2. – P.405–15.
165. Lipton S.A. Actions of redox–related congeners of nitric oxide at the NMDA receptor / S.A. Lipton, J.S. Stamler// Neuropharmacology. – 1994. –V.33. – P.229–1233.
166. Lohr M. Frequency of K–ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta–analysis / M. Lohr, G. Kloppel, P. Maisonneuve et al. // Neoplasia. – 2005. – V.7. – P.17–23.
167. Makar T.K. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain / T.K. Makar, M. Nedergaard, A. Preuss et al //J Neurochem. – 1994. – V.62. – №1. – P.45–53.
168. Mamikutty N. The Establishment of Metabolic Syndrome Model by Induction of Fructose Drinking Water in Male Wistar Rats / N. Mamikutty,

- Z.C. Thent, S.R. Sapri et al. // Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. – 2014. – V. 2014.
169. Masella R. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes / R. Masella, R. Di Benedetto et al // Nutr. Biochem. – 2005. – V. 16. – № 10. – P. 577–586.
 170. Mazzetti A.P., Fiorile M.C., Primavera A., Lo Bello M. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases / A.P. Mazzetti, M.C. Fiorile et al // Neurochem Int. – 2015. – V. 82. – P. 10–8.
 171. Merante F. The characterization and purification of a human transcription factor modulating the glutathione peroxidase gene in response to oxygen tension / F. Merante, S.M. Altamentova, D.A. Mickle et al // Molecular and cellular biochemistry. – 2002. – V. 229. – №. 1–2. – P. 73–83.
 172. Miller Anne–Frances. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights/ Anne–Frances Miller // FEBS Lett. – 2012. – V. – 586. – №5. – P. 585–595.
 173. Mills G.C. Hemoglobin catabolism. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown / G.C. Mills // J Biol Chem, – 1957. – V. 266. – P. 20752–20760.
 174. Mladin C. Deuterium depleted water has stimulating effects on longterm memory in rats/ C. Mladin, A. Ciobica, R. Lefter et al // Neuroscience Lett. – 2014. – V. 583. – №7. – P. 154–158.
 175. Monks T.J. Symposium overview: The role of glutathione in neuroprotection and neurotoxicity / T.J. Monks, J.F. Ghersi–Egea, M. Philbert et al // Tox. Sci. – 1999. – V. 51. – P. 161–177.
 176. Morrow C.S. Coordinated action of glutathione S–transferases (GSTs) and multidrug resistance protein 1 (MRP1) in antineoplastic drug detoxification. Mechanism of GST A1–1– and MRP1–associated resistance to chlorambucil in MCF7 breast carcinoma cells / C.S. Morrow P.K. Smitherman et al // J Biol Chem. – 1998. – V. 273. – P. 20114–20120.
 177. Nakano M. Assay for superoxide dismutase based on chemiluminescence of luciferin analog/ M. Nakano // Methods Enzymol. Acad. Press. – 1990. – V. 186. – P. 227–232.
 178. Nalecz–Jawecki G., Sawicki J. Toxicity of inorganic compounds in the Spirotox test: a miniaturized version of the Spirostomum ambiguum test / G. Nalecz–Jawecki, J. Sawicki // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 1998. – V. 34. – №1. – P. 1–5.

179. Oakley A. Glutathione transferases: a structural perspective / A. Oakley // *Drug Metab Rev.* – 2011. – V.43. – №2. – P.138–51.
180. Ohl K., Tenbrock K., Kipp M. Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action/ K. Ohl, K. Tenbrock, M. Kipp // *Exp. Neurol.* – 2016. – V. 277. – P.58–67.
181. Olariu Lucia. Brudiu Ileana. The role of deuterium depleted water (DDW) administration in blood deuterium concentration in Cr (VI) intoxicated rats / L. Olariu, M. Petcu et al // *Lucrări științifice medicină veterinară.* – 2010. – V. XLIII. – №2
182. Olariu Lucia. Comparative studies in cadmium scavenger deuterium depleted water product, in female and male rats / L. Olariu, M. Petcu et al // *Lucrări științifice medicină veterinară.* –2008. – VOL. XLI
183. Olariu Lucia. The influence of the deuterium depleted water in the experimental cadmium chloride intoxication on liver function in rats / L. Olariu, M. Petcu et al// *Lucrări științifice medicină veterinară.* – 2007. – V. XL
184. Ortiz G.G. Oxidative Stress: Love and Hate History in Central Nervous System / G.G. Ortiz, F.P. Pacheco Moisés et al// *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* – 2017. –V. 108. – P1–31.
185. Oshino N. The characteristics of the "peroxidatic" reaction of catalase in ethanol oxidation / N. Oshino, R. Oshino, B. Chance // *Biochem J.* – 1973. – V.131. – №3. – P. 555–63.
186. Ota M. Evidence that nitric oxide can act centrally to stimulate vasopressin release / M. Ota, J.T. Crofton et al // *Neuroendocrinology.* – 1993. – V. 57. – №5. – P. 955–959.
187. Oury T.D. Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase / T.D. Oury, J.D. Crapo et al // *Biochem. J.* – 1996. – V. 317. – № 1. – P. 51–57.
188. Owens M.J. Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor / M.J. Owens, C.B. Nemeroff // *Pharmacol Rev.* – 1991. – V.43. – № 4. – P. 425–473
189. Padovani D. Sulfheme formation during homocysteine S-oxygenation by catalase in cancers and neurodegenerative diseases / D. Padovani et al // *Nat. Commun.* –2016. –V. 7.
190. Panda B.B., Sahu U.K. Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the

- organophosphorus insecticide fensulfotion / B.B. Panda, U.K. Sahu // *Cytobios.* – 1985. – V.42. – P. 147–155.
191. Pantalone D. p53 and DPC4 alterations in the bile of patients with pancreatic carcinoma/ D. Pantalone, E. Pelo, B. Minuti et al. // *J. Surg. Oncol.* – 2004. – V.88. – №4. – P.210–216.
 192. Paolucci S. Iosa M, Coiro P, et al. Post–stroke Depression Increases Disability More Than 15% in Ischemic Stroke Survivors: A Case–Control Study/ S. Paolucci, M. Iosa, P. Coiro et al. // *Front Neurol.* – 2019. – V. – 926. – №10.
 193. Pedersen L.G., Bartolotti L., Li L. Deuterium and its role in the machinery of evolution / L.G. Pedersen, L. Bartolotti, L. Li // *J. Theor. Biol.* – 2006. – V.238. – P. 914–918.
 194. Peng D. Glutathione peroxidase 7 has potential tumour suppressor functions that are silenced by location–specific methylation in oesophageal adenocarcinoma / D. Peng, T. Hu, M. Soutto et al // *Gut.* – 2014. – V.63. – №4. – P. 540–51.
 195. Peng D. Glutathione peroxidase 7 protects against oxidative DNA damage in oesophageal cells / D. Peng, A. Belkhiri et al // *Gut.* – 2012. – V.61. – №9. – P. 1250–60.
 196. Perła–Kaján J. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans / J.P erła–Kaján, T. Twardowski, H. Jakubowski // *Amino Acids.* – 2007. – V.32. – №4. – P. 561–72.
 197. Petriev I.S. Hydrogen Permeability of a Foil of Pd–Ag Alloy Modified with a Nanoporous Palladium Coating / I.S. Petriev, S.N. Bolotin, V.Y. Frolov et al // *Bulletin of the Russian Academy of Sciences.* – 2018. – V. 82. – № 7. – P. 807–810.
 198. Pham K., Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA–NCAM expression in the adult rat dentate gyrus / K. Pham, J. Nacher, P.R. Hof, B.S. McEwen // *Eur. J. Neuroscience.* – 2003. – V. 17. – №4. – P. 879–886
 199. Rana S. Gap junction hemichannel–mediated release of glutathione from cultured rat astrocytes / S. Rana, R. Dringen // *Neurosci Lett.* – 2007. – V.415. – №1. – P.45–8.
 200. Rasooli A. Synergistic effects of deuterium depleted water and *Mentha longifolia* L. essential oils on sepsis–induced liver injuries through regulation of cyclooxygenase–2/ A. Rasooli, F. Fatemi et al // *Pharm Biol.* – 2019. – V.57. – №1. – P. 125–132.

201. Rasooli A. Synergistic protective activity of deuterium depleted water (DDW) and Satureja rechingeri essential oil on hepatic oxidative injuries induced by acetaminophen in rats / A. Rasooli, F. Fatemi et al //TEOP. – 2016. – V.19. – P. 1086–1101.
202. Rauchová, H. Hypoxia–induced lipid peroxidation in the brain during postnatal ontogenesis / H. Rauchová, M. Vokurková, J. Koudelová // Physiol. Res. – 2012. – V. 61. – №1. – P. 89–101.
203. Rezacova R. Effect of Deuterium–Depleted Water on Selected Cardiometabolic Parameters in Fructose–Treated Rats / R. Rezacova, J. Klimentova et al // Physiol Res.– 2016. – V.24. – № 3. – P.401–407.
204. Rosen D.R. in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis / D.R. Rosen, T. Siddique et al // Nature. – 1993. – V.362. – P. 59–62.
205. Ross J. A., Laws W. R., Rousslang K. W. Topics in fluorescence in spectroscopy/ J. A. Ross, W. R. Laws, K. W. Rousslang //Springer US. – 2002. – V.6. – P. 1–64.
206. Rueda C.B. Glutamate excitotoxicity and Ca²⁺ –regulation of respiration: Role of the Ca²⁺ activated mitochondrial transporters (CaMCs) / C.B. Rueda, I. Llorente–Folch, J. Traba et al. // Biochemistry Biophysics Acta – 2016. – V.1857. – №8. – P. 1158–1166.
207. Sacco R.L. Risk factors, outcomes, and stroke subtypes for ischemic stroke / R.L. Sacco //Neurology. – 1997. – V.49. – P.39–44.
208. Sasaki N. Vascular Diseases and Gangliosides / N. Sasaki, M. Toyoda //Int J Mol Sci. – 2019. – V.20. – №24.
209. Schutte M. Abrogation of the Rb/p16 tumor–suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas / M. Schutte, R. Hruban, J. Geradts et al. // Cancer Res. – 1997. –V.57. – № 15. – P.3126–30.
210. Schwartz R. D. Regulation of g–aminobutyric acid/barbiturate receptor–gated chloride ion flux in brain vesicles by phospholipase A₂: possible role of oxygen radicals / R. D. Schwartz, P. Skolnick, S.M. Paul // Journal of Neurochemistry. – 1988. –V.50. – P. 565–571.
211. Seabra A. Studies on catalase inhibition as related to tumors / A. Seabra, H.F. Deutsh //J Biol Chem. – 1955. – V. 214. – №1. –P.447–54.
212. Sedlak J. Estimation of total, protein–bound and nonprotein sulthudryl groups in tissue witch Ellmans–reagent / J. Sedlak, R.H. Lindsay //Anal. Biochem. – 1968. – V.25. – P.192–205.
213. Sen S. Maintenance of higher H₂O₂ levels, and its mechanism of action to induce growth in breast cancer cells: important roles of bioactive catalase

- and PP2A / S. Sen, B. Kawahara, G. Chaudhuri // *Free Radic Biol Med.* – 2012. – V. 53. – №8. – P.1541–51.
214. Shaw B.F. How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein? / B.F. Shaw, J.S. Valentine // *Trends Biochem Sci.* – 2007. – V.32. – №2. – P.78–85.
215. Sheehan D. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily / D. Sheehan, G. Meade et al // *Biochem J.* – 2001. – V.360. – №1. – P. 1–16.
216. Sies H. Reactive oxygen species in biology and medicine/ H. Sies, U. Hagen et al// *Radiat. Res.*– 1995. – V. 2. – P. 193–198.
217. Siesjo E. Free radicals and brain damage / E. Siesjo, C. Agadh, F. Bengtsson // *Brain Metab. Rev.* – 1989. – V.1. – №3. – P. 165–211.
218. Sinning C. Oxidative stress in ischemia and reperfusion: current concepts, novel ideas and future perspectives / C. Sinning, D. Westermann, P. Clemmensen // *Biomark Med.* – 2017. – V.11. – №11. – P.11031–11040.
219. Slivka A. Reduced and oxidized glutathione in human and monkey brain / A. Slivka, M.B. Spina, G. Cohen // *Nerosci. Lett.* – 1987. – V. 74. – № 1. – P. 112–118.
220. Soleyman-Jahi S. In vitro assessment of antineoplastic effects of deuterium depleted water / S. Soleyman-Jahi, K. Zendehdel et al // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2014. – V.15. – №5. – P. 2179–83.
221. Somlyai G. Naturally occurring deuterium may have a central role in cell signaling / G. Somlyai, G. Laskay et al // *Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds.* – 1997. – V. 24. –P.137–141.
222. Somlyai G. Naturally occurring deuterium is essential for the normal growth rate of cells / G. Somlyai, G. Jancsó et al// *FEBS Letters.* – 1993. – V.317. – №1. – P.1–4.
223. Somlyai G. The biological effects of deuterium-depleted water, a possible new tool in cancer therapy / G. Somlyai, G. Laskay et al // *Journal of Oncology.* – 1998. – V. 30. – №4. – P. 91–94.
224. Stadtman E.R. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease / E.R. Stadtman, B.S. Berlett // *Drug Metab. Rev.*–1998. –V. 30. – №2. – P.225–243.
225. Stanimirovic D. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation / D. Stanimirovic, K. Satoh // *Brain Pathology.* – 2000. – V. 10. – №1. – P.113–126.

226. Steinmeier J. Exposure of Cultured Astrocytes to Menadione Triggers Rapid Radical Formation, Glutathione Oxidation and Mrp1–Mediated Export of Glutathione Disulfide / J. Steinmeier, R. Dringen // *Neurochem Res.* – 2019. – V. 44. – №5. – P.1167–1181.
227. Stevens J.F. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease / J.F. Stevens, C.S. Maier // *Mol Nutr Food Res.* – 2008. – V.52. – №1. – P.7–25.
228. Stratakis C.A. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system / C.A. Stratakis, G.P. Chrousos // *Ann. N.Y.Acad. Sci.* – 1996. – V.771. – P. 1–18.
229. Strekalova T. Deuterium content of water increases depression susceptibility: the potential role of a serotonin–related mechanism / T. Strekalova, M. Evans et al // *Behav Brain Res.* – 2015. – V. 277. – P.237–44.
230. Sturtz L. A. A fraction of yeast Cu,Zn–superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage / L.A. Sturtz, K. Diekert et al // *J Biol Chem.* – 2001. – V.276. – №41. – P. 38084–38089
231. Suda S. Therapeutic potential of AMPA receptor antagonist perampanel against cerebral ischemia: beyond epileptic disorder / S. Suda, K. Kimura // *Neural Regen Res.* – 2019. – V. 14. – №9. – P.1525–1526.
232. Sun L. Evaluation of KIF23 variant 1 expression and relevance as a novel prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma / L. Sun, Z. Jin et al // *BMC Cancer.* – 2015. – V. 15. – №1. – P. 961–967.
233. Syroeshkina A.V. The effect of the deuterium depleted water on the biological activity of the eukaryotic cells / A.V. Syroeshkina, N.V. Antipovaab et al // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* – 2018. – V. 50. – P. 629–633.
234. Takahashi K. Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from c DNA sequences / K. Takahashi, M. Akasaka et al // *J. Biochem. (Tokyo).* – 1990. – V. 108. – P. 145–148.
235. Tamjeed A. Siddiqui. Complex molecular and functional outcomes of single versus sequential cytokine stimulation of rat microglia / T. A. Siddiqui, S. Lively et al // *J Neuroinflammation.* – 2016. – V. 13. – № 66.
236. Thomas J.P., Geiger P.G., Maiorino M., Ursini F., Girotti A.W. Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins / J.P. Thomas, P. G. Geiger et al // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. – V. 1045. – P. 252–260.

237. Tedefelt U. Expression of glutathione transferase pi as a predictor for treatment results at different stages of acute nonlymphoblastic leukemia / U. Tedefelt, A. Elmhorn–Rosenborg et al // *Cancer Res.* – 1992. – V. 52. – P.3281–3285.
238. Tiwari M. K. Copper ion H₂O₂ oxidation of Cu/Zn–Superoxide dismutase: Implications for enzymatic activity and antioxidant action / M. K Tiwari, P. M. Hägglund et al // *Redox Biology.* – 2019. – V.26.
239. Toledano M.B. The Unfinished Puzzle of Glutathione Physiological Functions, an Old Molecule That Still Retains Many Enigmas / M.B. Toledano, M.E. Huang // *Antioxid Redox Signal.* – 2017. – V. 27. – №15. – P. 1127–1129.
240. Ursini F. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation / F. Ursini, S. Heim et al//*Science.* – 1999. –V. 285. – P. 393–1396.
241. Vesce S. Acute Glutathione Depletion Restricts Mitochondrial ATP Export in Cerebellar Granule Neurons / S. Vesce, M.B. Jekabsons et al // *J. Biol. chem.* – V. 280. – № 46. – P. 38720–38728.
242. Vetich N. C. Structural determinants of plant peroxidase function / N. C. Vetich // *Phytochem. Rev.* – 2004. –V.3. – № 1–2. – P. 3–18.
243. Wang H. Deuterium depleted water (DDW) inhibits the proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma cells in vitro / H. Wang, B. Zhu et al // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2013. – V. 67. – P. 489–496.
244. Waxman E. A. N–methyl–D–aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease / E. A. Waxman, D. R. Lynch // *Neuroscientist.* – 2005. – V. 11. – P.37–49.
245. Wei P.C. Loss of the oxidative stress sensor NPGPx compromises GRP78 chaperone activity and induces systemic disease / P.C. Wei, Y.H. Hsieh et al // *Mol Cell.* – 2012. – V. 48. – №5. – P. 747–59.
246. Weisiger R. A. Superoxide dismutase / R. A. Weisiger, I. Fridovich // *The J. Of Biol.Chem.* – 1973. – Vol. 248. – №10. – P. 3582–3592.
247. Whalen R. Human glutathione S–transferases / R. Whalen, T.D. Boyer / *Semin Liver Dis.* – 1998. – V. 18. – №4. – P. 345–358.
248. Wild C.P. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions / C.P. Wild, P.C. Turner // *Mutagenesis.* – 2002. – V.17. – P.471–481.
249. Wu Y. Neuroprotective Effects of Deuterium-Depleted Water (DDW) Against H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Differentiated PC12 Cells Through the PI3K/ Y. Wu, D. Qin, H. Yang et al// *Akt Signaling Pathway. Neurochem Res.* - 2020. – V.45. - №5. – P.1034-1044.

250. Yang W.S. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation / W.S. Yang, B.R. Stockwell // *Trends Cell Biol.* – 2016. – V. 26. – №3. – P. 165–176.
251. Yang Z.J. Hyperbaric oxygenation mitigates focal cerebral injury and reduces striatal dopamine release in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion / Z.J. Yang, C. Camporesi, X. Yang et al// *Eur J Appl Physiol.* – 2002. – V.87. – №2. – P.101–117.
252. Yant L.J. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults / L.J. Yant, Q. Ran, L. Rao et al// *Free Radic. Biol. Med.* – 2003. –V. 34. – P. 496–502.
253. Yavar K. Deuterium Depleted Water Inhibits the Proliferation of Human MCF7 Breast Cancer Cell Lines by Inducing Cell Cycle Arrest / K. Yavar, L. Kooshesh // *Nutrition and Cancer.* – 2019. – V.71, № 6. – P. 1019–1029.
254. You J.M. Mechanism of glucocorticoid–induced oxidative stress in rat hippocampal slice cultures / J.M. You, S.J. Yun, K.N. Nam et al// *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* – 2009. – V. 87. – № 6. – P. 440–447.
255. Zhang H. Glutathione synthesis and its role in redox signaling / H. Zhang, H.J. Forman // *Semin Cell Dev. Biol.* – 2012. – V.23. – №7. – P.722–728.
256. Zhang X. Anticancer effect of deuterium depleted water – redox disbalance leads to oxidative stress / X. Zhang, M. Gaetani, A. Chernobrovkin, R. Zubarev // *Molecular & Cellular Proteomics.* – 2019. – V.18. – № 12. – P. 2373–2387.
257. Zlatska A. In Vitro Study of Deuterium Effect on Biological Properties of Human Cultured Adipose–Derived Stem Cells / A. Zlatska, I. Gordiienko, R. Vasyliiev et al // *Sci. World J.* – 2018. –V. 2018. – P .1–10.