

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«Воронежский государственный университет»

На правах рукописи

Веревкин Алексей Николаевич

РЕГУЛЯЦИЯ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА В ТКАНЯХ
КРЫС ПРИ ОКСИДАТИВНОМ СТРЕССЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ
РАЗВИТИЕМ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА И РЕВМАТОИДНОГО
АРТРИТА, ВОЗДЕЙСТВИЕМ МЕЛАТОНИН-КОРРИГИРУЮЩИХ
ПРЕПАРАТОВ

Специальность 03.01.04 - Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук,
профессор Попова Т.Н.

Воронеж 2016

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	9
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Осидативный стресс как неспецифическое звено патологических процессов	14
1.2. Сахарный диабет	15
1.2.1. Общая характеристика и механизмы развития различных типов сахарного диабета	15
1.2.2. Этиология и патогенез сахарного диабета 1 типа	17
1.2.3. Причины развития сахарного диабета 2 типа	19
1.2.4. Генерация активных кислородных метаболитов при развитии сахарного диабета 2 типа.....	21
1.3. Ревматоидный артрит	23
1.3.1. Патогенез и этиология ревматоидного артрита	23
1.3.2. Диагностика и лечение ревматоидного артрита	25
1.3.3. Интенсивность свободнорадикальных процессов при развитии ревматоидного артрита.....	27
1.4. Система защиты организма от действия свободных радикалов	30
1.4.1. Ферментативное звено антиоксидантной системы	31
1.4.1.1. Супероксиддисмутаза и каталаза	31
1.4.1.2. Глутатионовое звено антиоксидантной системы и НАДФН-генерирующие ферменты	33
1.4.2. Неферментативное звено антиоксидантной системы	41
1.4.2.1. Водорастворимые низкомолекулярные антиоксиданты.....	41
1.4.2.2. Жирорастворимые низкомолекулярные антиоксиданты.....	43
1.5. Характеристика мелатонина	45
1.5.1. Синтез мелатонина в организме	45
1.5.2. Биологическая роль в организме	48

1.5.3. Вещества, корригирующие уровень мелатонина.....	51
1.5.3.1. Мелаксен	51
1.5.3.2. Эпифамин.....	52
1.5.3.3. Вальдоксан	53
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	55
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
2.1. Объект исследования	55
2.2. Методы исследования.....	55
2.2.1. Создание модели сахарного диабета 2 типа у крыс	55
2.2.2. Создание модели ревматоидного артрита у крыс.....	56
2.2.3. Подготовка материала для исследования	56
2.2.4. Определение уровня глюкозы в сыворотке крови.....	57
2.2.5. Определение содержания ревматоидного фактора	58
2.2.6. Определение скорости оседания эритроцитов.....	58
2.2.7. Оценка оксидативного статуса	58
2.2.7.1. Определение интенсивности биохемилюминесценции	58
2.2.7.2. Определение содержания диеновых конъюгатов	59
2.2.7.3. Определение степени фрагментации ДНК.....	60
2.2.7.3.1. Выделение тотальной ДНК.....	60
2.2.7.3.2. Электрофорез ДНК	61
2.2.7.4. Определение активности каспаз.....	62
2.2.8. Измерение активности ферментов	62
2.2.8.1. Определение активности ферментов, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАДФ.....	63
2.2.8.1.1. Определение активности глутатионпероксидазы.....	63
2.2.8.1.2. Определение активности глутатионредуктазы	64
2.2.8.1.3. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	64
2.2.8.1.4. Определение активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы	64
2.2.8.2. Определение активности глутатионтрансферазы.....	65

2.2.8.3. Определение активности аконитатгидратазы	66
2.2.8.4. Определение активности супероксиддисмутазы	66
2.2.8.5. Определение активности каталазы.....	67
2.2.9. Определение содержания компонентов неферментативной антиоксидантной системы.....	68
2.2.9.1. Определение концентрации восстановленного глутатиона	68
2.2.9.2. Определение содержания цитрата.....	69
2.2.10. Унифицированный метод определения содержания общего белка по биуретовой реакции	70
2.2.11. Определение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов.....	71
2.2.11.1. Выделение тотальной РНК	71
2.2.11.1. Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция	71
2.3. Статистическая обработка экспериментальных данных	73
3.1. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на уровень гликемии у крыс при сахарном диабете 2 типа.....	74
3.2. Оценка интенсивности свободнорадикального окисления в печени, почках, сыворотке и сердце крыс с сахарным диабетом 2 типа при введении эпифамина, мелаксена и вальдоксана	77
3.2.1. Влияние мелатонин-корректирующих препаратов на интенсивность биохемилюминесценции и уровень первичных продуктов пероксидного окисления липидов в тканях крыс с сахарным диабетом 2 типа	77
3.2.2. Активность каспаз в тканях крыс при сахарном диабете 2 типа и введении мелатонин-корректирующих препаратов.....	85
3.2.3. Оценка степени фрагментации ДНК в тканях крыс с сахарным диабетом 2 типа при введении препаратов, корректирующих уровень мелатонина.....	87
3.2.4. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на активность аконитатгидратазы и уровень цитрата в тканях крыс при развитии сахарного диабета 2 типа.....	89

3.3. Оценка антиоксидантного потенциала тканей крыс при сахарном диабете 2 типа и действии мелатонин-корректирующих препаратов.	98
3.3.1. Анализ активности супероксиддисмутазы и каталазы в печени, почках, сыворотке и сердце крыс с сахарным диабетом 2 типа и введении эпифамина, мелаксена и вальдоксана	98
3.3.2. Влияние мелатонин-корректирующих препаратов на активность глутатионового звена антиоксидантной защиты в тканях крыс при сахарном диабете 2 типа.....	110
3.3.3. Активность некоторых НАДФ-зависимых ферментов в тканях экспериментальных животных при сахарном диабете 2 типа и действии исследуемых веществ-протекторов.....	128
3.3.4. Анализ уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов в тканях крыс с сахарным диабетом 2 типа на фоне введения мелатонин-корректирующих препаратов	140
ГЛАВА 4. ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕЛАТОНИН-КОРРЕГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ МЕЛАТОНИН-КОРРЕГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА	153
4.1. Воздействие эпифамина и мелаксена на маркерные показатели развития экспериментального ревматоидного артрита у крыс	153
4.2. Оценка интенсивности свободнорадикального окисления в мышцах и сыворотке крови крыс с экспериментальным ревматоидным артритом при введении мелатонин-корректирующих препаратов.....	155
4.2.1. Влияние эпифамина и мелаксена на интенсивность биохемилюминесценции и уровень первичных продуктов пероксидного окисления липидов в исследуемых тканях крыс с экспериментальным ревматоидным артритом.....	155
4.2.2. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на активность каспаз в мышцах крыс с экспериментальным ревматоидным артритом	159

4.2.3. Влияние эпифамина и мелаксена на степень фрагментации ДНК в мышцах крыс с экспериментальным ревматоидным артритом	160
4.2.4. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на активность аконитатгидратазы и уровень цитрата в исследуемых тканях крыс при развитии экспериментального ревматоидного артрита	161
4.3. Оценка антиоксидантного потенциала тканей крыс при действии мелатонин-корректирующих препаратов на фоне развития экспериментального ревматоидного артрита.....	165
4.3.1. Изменение активностей супероксиддисмутазы и каталазы в мышцах и сыворотке крови крыс при введении эпифамина и мелаксена животным с экспериментальным ревматоидным артритом.....	165
4.3.2. Влияние мелатонин-корректирующих препаратов на активность глутатионового звена антиоксидантной защиты в тканях крыс при экспериментальном ревматоидном артрите	170
4.3.3. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на активность НАДФН-генерирующих ферментов в тканях экспериментальных животных с экспериментальным ревматоидным артритом.....	178
4.3.4. Анализ уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов в тканях крыс с экспериментальным ревматоидным артритом и введении мелатонин-корректирующих препаратов.....	183
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	190
ВЫВОДЫ.....	195
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	197

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АГ – аконитатгидратаза;
- АОС – антиоксидантная система;
- АФК – активные формы кислорода;
- АФМК – N1-ацетил-N2-формил-5-метилкинурамин;
- БХЛ – биохемилюминесценция
- Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа;
- ГЛЮТ – глюкозные транспортёры;
- ГП – глутатионпероксидаза;
- ГР – глутатионредуктаза;
- ГТ – глутатионтрансфераза;
- ДК – диеновые конъюгаты;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ИЛ – интерлейкины;
- ИЛ-1 β – интерлейкин-1 β ;
- МТ – мембранные рецепторы мелатонина;
- НАД – никотинамидадениндинуклеотид;
- НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный;
- НАДФ – никотинамидадениндинуклеотид фосфат;
- НАДФ-ИДГ – НАДФ-изоцитратдегидрогеназа;
- НАДФН – никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный;
- ОС – оксидативный стресс;
- ПОЛ – пероксидное окисление липидов;
- РА – ревматоидный артрит;
- РНК – рибонуклеиновая кислота;
- РФ – ревматоидный фактор;
- СД – сахарный диабет;
- СД1 – сахарный диабет 1 типа;
- СД2 – сахарный диабет 2 типа;

CO – свободнорадикальное окисление;
СОД – супероксиддисмутаза;
СОЭ – скорость оседания эритроцитов;
СРБ – С-реактивный белок;
СРП – свободнорадикальные процессы;
ФНО- α – фактор некроза опухоли альфа;
ЦОГ – циклооксигеназа;
GSH – восстановленный глутатион;
GSSG – окисленный глутатион;
H₂O₂ – пероксид водорода;
HLA – главный комплекс гистосовместимости;
Ig – иммуноглобулины;
I_{max} – интенсивность вспышки хемилюминесценции;
NO – оксид азота;
NOS – NO-синтаза;
O₂^{•-} – супероксидный анион-радикал;
OH[•] – гидроксильный радикал;
ONOO[•] – пероксинитрит;
S – светосумма хемилюминесценции;
tg α 2 – величина тангенса угла наклона касательной к кривой хемилюминесценции.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Согласно современным воззрениям в основе многих патологических состояний лежит чрезмерное возрастание скорости свободнорадикального окисления (СО) биосубстратов, что в условиях недостаточности антиоксидантной защиты приводит к развитию окислительного стресса (ОС). К заболеваниям, патогенез которых включает интенсивную генерацию активных форм кислорода (АФК), относятся сахарный диабет 2 типа (СД2) и ревматоидный артрит (РА). Так, при СД2 активация полиолового и гексозаминового путей окисления глюкозы, а также неферментативного гликозилирования белков ведет к накоплению свободных радикалов [7]. Наличие продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ), окисленных липопротеинов низкой плотности и карбонильных групп, отражающих степень окислительного повреждения белков, в синовиальной жидкости подтверждает ведущую роль ОС в патогенезе РА [103, 151, 223]. Интенсификация свободнорадикальных процессов (СРП) при развитии СД2 и РА приводит к нарушению структуры и функций клеток и тканевых систем организма. Защиту от повреждающего действия свободных радикалов осуществляет многоуровневая система антиоксидантной защиты.

Значительный интерес представляет исследование эндогенных и экзогенных факторов, способных влиять на активность антиоксидантных систем (АОС) организма и/ или обладающих собственным антиоксидантным потенциалом. К веществам подобного спектра действия могут быть отнесены эпифамин, мелаксен и вальдоксан. Данные препараты способны оказывать воздействие на метаболизм мелатонина – гормона, обладающего широким спектром действия и выраженной антиоксидантной активностью [112]. Так, в состав эпифамина входит комплекс белков и нуклеопротеидов, которые обладают избирательным действием на клетки эпифиза, что способствует стимулированию синтеза и секреции мелатонина [26]. Мелаксен включает в свой состав данный гормон, синтезированный из аминокислот растительного

происхождения. Вальдоксан является селективным агонистом MT1 и MT2 мелатониновых рецепторов и, тем самым, способен оказывать эффекты, характерные для данного гормона [241]. В связи с этим приобретает актуальность исследование влияния данных мелатонин-корректирующих препаратов на свободнорадикальный гомеостаз при патологических состояниях, сопряженных с оксидативным стрессом – СД2 и РА.

Цель и задачи исследования. Цель работы – исследование воздействия мелатонин-корректирующих препаратов – эпифамина, мелаксена и вальдоксана, на свободнорадикальный гомеостаз в тканях крыс при оксидативном стрессе, индуцированном развитием сахарного диабета 2 типа и ревматоидного артрита.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Оценка влияния мелатонин-корректирующих препаратов на маркерные показатели развития СД2 и РА в сыворотке крови крыс.

2. Анализ воздействия эпифамина, мелаксена и вальдоксана на интенсивность протекания СРП в тканях экспериментальных животных с СД2 и РА на основе параметров биохемилюминесценции (БХЛ), уровня диеновых конъюгатов (ДК) и активности аконитатгидратазы (АГ), являющейся маркерным ферментом развития ОС.

3. Выявление антиапоптотического эффекта исследуемых лекарственных средств на фоне развития патологий, сопряженных с ОС.

4. Изучение влияния мелатонин-корректирующих препаратов на активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, а также на функционирование глутатионовой АОС – активность глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), глутатионтрансферазы (ГТ) и уровень восстановленного глутатиона (GSH), в тканях животных с СД2 и РА.

5. Анализ уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов при действии эпифамина, мелаксена и вальдоксана на фоне развития СД2 и РА.

6. Определение активности НАДФН-генерирующих ферментов в тканях крыс при введении мелатонин-корректирующих препаратов животным с СД2 и РА.

7. Создание гипотетической схемы, отражающей воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на свободнорадикальный гомеостаз при патологиях, сопряженных с развитием ОС.

Научная новизна. Впервые осуществлено комплексное исследование воздействия мелатонин-корректирующих препаратов на интенсивность СО биомолекул, активности ферментативных и неферментативных компонентов АОС, ряда ферментов окислительного метаболизма, а также уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов в тканях крыс с СД2 и РА. Установлено, что введение эпифамина, мелаксена и вальдоксана при развитии патологий, сопряженных с ОС, приводит к уменьшению интенсивности СРП и коррекции функционирования ферментов АОС в тканях крыс. При этом также отмечено снижение интенсивности апоптотических процессов. Выявлено снижение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов в тканях крыс с СД2 и РА при введении эпифамина, мелаксена и вальдоксана, что соотносится с изменениями активности ферментов и свидетельствует об уменьшении степени мобилизации АОС в условиях торможения оксидативного стресса. Проведен сравнительный анализ эффектов различных доз исследуемых лекарственных средств. Осуществлено исследование воздействия мелатонин-корректирующих препаратов на активность ферментов-поставщиков восстановительных эквивалентов в виде НАДФН для работы глутатионовой АОС в тканях крыс с исследуемыми патологиями. Предложена гипотетическая схема влияния мелатонин-корректирующих препаратов на регуляцию свободнорадикального гомеостаза при патологиях, сопряженных с развитием ОС.

Практическая значимость. Полученные данные о корректирующем воздействии эпифамина, мелаксена и вальдоксана на свободнорадикальный

гомеостаз в тканях крыс в условиях развития патологических состояний, сопряженных с окислительным стрессом, свидетельствуют о возможности применения данных лекарственных средств для коррекции оксидативного статуса при СД2 и РА. Результаты работы углубляют фундаментальные представления о путях реализации протекторного действия веществ, обладающих антирадикальным потенциалом, что создает основы для развития антиоксидантной терапии.

Материалы работы используются в учебном процессе на медико-биологическом и фармацевтическом факультетах Воронежского государственного университета при чтении курсов «Интеграция обменных процессов в организме», «Свободнорадикальные процессы в биологических системах», «Биологическая химия», а также спецкурсов по патобиохимии и энзимологии. Кроме того, они используются при проведении практикумов, выполнении курсовых, выпускных квалификационных работ и магистерских диссертаций студентами Воронежского госуниверситета.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на V Международной научно-практической конференции «Современное состояние естественных и технических наук» (Москва, 2011), на VII международной научно-практической телеконференции «Актуальные проблемы современной науки» (Томск, 2012), на IX международной научно-практической конференции «Современные достижения науки-2013» (Прага, 2013), в материалах 5-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2013» (Воронеж, 2013), на VI Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013), в Материалах 10 научно-практической конференции «Актуальные научные разработки – 2014» (София, 2014), на Международной научной конференции «Постгеномные технологии в медицине: от теории к практике» (Воронеж, 2015)

Публикации. Основные результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, изложены в 25 публикациях, из них 3 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Выявлено дозозависимое протекторное действие мелатонин-корректирующих препаратов при патологиях, сопряженных с ОС – СД2 и РА, обеспечивающее снижение маркерных показателей развития заболеваний, а также интенсивности свободнорадикальных и апоптотических процессов.

2. Введение эпифамина, мелаксена и вальдоксана экспериментальным животным при СД2 и РА способствует приближению показателей ключевых компонентов АОС к контрольным значениям.

3. При действии мелатонин-корректирующих препаратов на фоне СД2 и РА активность ряда ферментов окислительного метаболизма – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), НАДФ-изоцитратдегидрогеназы (НАДФ-ИДГ) и АГ, изменяется в направлении нормы.

Структура и объем работы. Диссертация представлена на 221 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения полученных результатов (2 главы), заключения, выводов и списка литературы (256 источников). Иллюстративный материал включает 59 рисунков и 9 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Оксидативный стресс как неспецифическое звено патологических процессов

Оксидативный стресс – состояние гиперпродукции АФК вследствие дисбаланса функционирования про- и антиоксидантных систем клетки. Реакции электронного транспорта в митохондриях и цитохром Р-450-зависимые оксигеназные реакции в мембранах эндоплазматического ретикулаума являются основными источниками реактивных молекул.

По современным представлениям, патобиохимический и клеточный синдром ОС лежит в основе многих патологических состояний и «главных неинфекционных болезней» человека [22]. Среди последних ведущее место занимают злокачественные новообразования, атеросклероз, сахарный диабет (СД), нейродегенеративные поражения головного мозга и другие хронические заболевания, присущие пожилому и старческому возрасту, а также широкий круг патологий, связанный с возрастающим химическим загрязнением биоценоза и внутренней среды организма человека [1].

Многочисленными исследованиями было установлено, что в качестве иницирующего этапа развития ОС при указанном широком классе патологических состояний человека и животных выступает единый фундаментальный биохимический и биофизический механизм – избыточное образование в биологических системах свободных радикалов.

Свободный радикал – это атомная или молекулярная частица, которая имеет неспаренный электрон на внешней атомной или молекулярной орбитали. Наличие неспаренного электрона приводит к появлению у атома или молекулы свободной валентности, что обуславливает высокую химическую активность свободных радикалов в реакциях с различными биоорганическими субстратами и, вследствие этого, возможностью повреждения биологически значимых молекул живого организма [1, 38].

1.2. Сахарный диабет

1.2.1. Общая характеристика и механизмы развития различных типов сахарного диабета

Сахарный диабет – группа метаболических заболеваний, общим клиническим проявлением которых является стойкое повышение уровня сахара в крови. СД является одним из социально-значимых заболеваний. По имеющимся данным на начало 2015 года в нашей стране насчитывается более 4 млн. больных, что составляет 2,8% населения [18]. Преимущественно увеличение распространенности синдрома хронической гипергликемии отмечается за счет СД2, что подтверждает глобальные мировые тенденции роста распространенности и увеличения доли данной патологии среди общего количества пациентов с СД.

Результатом гипергликемии, на фоне абсолютной или относительной недостаточности инсулина, является нарушение обмена веществ, ангиопатия, патологические изменения в различных органах и тканях.

В большинстве тканей, особенно в жировой и скелетной мускулатуре, инсулин увеличивает потребление глюкозы, стимулируя увеличение числа плазматических мембранных транспортеров глюкозы. В эукариотических клетках различают два различных типа мембраносвязанных белков-переносчиков глюкозы: Na^+ -зависимые котранспортеры (SGLT) и собственно транспортеры (ГЛЮТ). Первый тип рецепторов включает в свой состав два котранспортера глюкозы (SGLT1 и SGLT2) и один глюкозо-чувствительный ионный канал (SGLT3) [69]. Семейство транспортеров глюкозы типа ГЛЮТ включает 14 членов, которые объединяются в 3 класса [143]. Отдельные изоформы различаются субстратной специфичностью, кинетическими характеристиками и профилями экспрессии, что способствует тканеспецифичной адаптации поглощения глюкозы путем изменения экспрессии генов. Так, известно, что ГЛЮТ1 присутствует в большинстве тканей и наибольший его уровень наблюдается в эритроцитах и

эндотелиальных клетках мозга. ГЛЮТ2 – низкоаффинный транспортер, который находится в основном в кишечнике, β -клетках поджелудочной железы, клетках почек и печени. Поглощение глюкозы этими тканями не зависит от количества и активности инсулина, а только от концентрации глюкозы в циркулирующей крови [120]. Кроме того, ГЛЮТ2 транспортирует фруктозу [255] и глюкозамины [116]. ГЛЮТ3 находится в основном в нейронах, но также и в кишечнике. ГЛЮТ4 находится в инсулин-чувствительных тканях, таких как сердце, жировая ткань и скелетная мускулатура. Инсулин стимулирует транслокацию данного транспортера из цитоплазмы на поверхность клетки, что приводит к 10-20 – кратному увеличению поступления глюкозы в клетку [67]. Транслокацию ГЛЮТ4 в скелетных мышцах могут также стимулировать мышечное сокращение и гипоксия [79]. ГЛЮТ5 экспрессируется в кишечнике, почках, яичках, скелетных мышцах, жировой ткани и головного мозга. Другие транспортеры были обнаружены относительно недавно и их функции на данный момент не до конца изучены.

Помимо увеличения проницаемости клеток для глюкозы, инсулин активирует ключевые ферменты гликолиза, стимулирует образование гликогена в печени и мышцах, усиливает синтез жиров и белков. Помимо этого, инсулин оказывает ингибирующее действие на ферменты, участвующие в расщеплении гликогена и липидов. Таким образом, инсулин обладает как анаболическим, так и антикатаболическим действием.

Согласно последним воззрениям СД делят на следующие типы: сахарный диабет 1 типа (СД1), СД2, а также другие специфические типы СД (генетические дефекты β -клеток, лекарственный диабет, эндокринопатии и др.) [175].

Гипергликемия способствует усилению катаболизма жиров и белков с развитием кетоацидоза. На фоне стабильно высокого содержания сахара повышается осмотическое давление крови. Это ведет к развитию полиурии – значительной потере воды и электролитов с мочой. Это отрицательно

сказывается на состоянии многих органов и тканей, что может привести к развитию тяжёлых осложнений, в том числе диабетической нефропатии, нейропатии, офтальмопатии, микро- и макроангиопатии, различным видам диабетической комы. У больных диабетом нарушается функционирование иммунной системы, что проявляется тяжелым течением инфекционных заболеваний [35].

Клиническими критериями постановки диагноза СД являются:

1. Уровень глюкозы натощак составляет более 7 ммоль/л. Нормальное содержание находится в пределах 3,3-5,5 ммоль/л.
2. Уровень глюкозы в плазме превышает 11,1 ммоль/л при проведении глюкозо-толерантного теста.

Декомпенсация СД сопровождается нарушениями коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного звеньев гемостаза на фоне эндотелиальной дисфункции, обусловленной метаболическим и окислительным стрессом, гипергликемией и гиперлипидемией [17, 22, 23, 45, 76]. Характерными проявлениями для СД являются наличие гиперкоагуляции, гиперагрегации и снижение активности фибринолиза, о чем свидетельствует увеличение содержания в плазме крови больных СД тромбосана А2, простагландинов В2, Н2, факторов II, VII, XII, фибриногена, фактора Виллебранда, эндотелина-1, тромбоцитарного фактора-3 тканевого активатора плазминогена, ингибитора-1 активатора плазминогена, и снижение содержания простациклина I2, протеина С и антитромбина III [8, 11, 58].

1.2.2. Этиология и патогенез сахарного диабета 1 типа

Известно, что в развитии СД1 лежит массивное разрушение β -клеток поджелудочной железы (островков Лангерганса), что влечет за собой критическое снижение содержания инсулина в крови [35]. Этиологическим фактором заболевания могут явиться вирусные инфекции, онкологические заболевания, панкреатит, токсические поражения поджелудочной железы,

стрессовые состояния, различные аутоиммунные заболевания. Результатом этого является выработка клетками иммунной системы антител против β -клеток поджелудочной железы, что приводит к их разрушению. Считается, что данный тип диабета, в подавляющем большинстве случаев, характерен для детей и лиц молодого возраста.

Зачастую данное заболевание связано с дефектами определенных генов, которые расположены в 6-ой хромосоме. Мутации подобного рода ведут к развитию аутоиммунной агрессии организма к клеткам поджелудочной железы и снижают регенеративную способность β -клеток [36]. Поражение клеток определенными цитотоксическими агентами способствует выделению аутоантигенов, которые стимулируют активность макрофагов и Т-киллеров. Это приводит к образованию и выделению в кровь интерлейкинов в концентрациях, оказывающих токсическое действие на клетки поджелудочной железы [35].

Выделяют следующие типы аутоантител:

1. Антитела к цитоплазматическим белкам β -клеток поджелудочной железы. Данные антитела обнаруживаются у 90% пациентов с СД1 при появлении клинических симптомов заболевания (по сравнению с 0,1 - 0,5% в контрольной группе пациентов без диабета). Титр данных антител имеет тенденцию к снижению с течением времени.
2. Антитела к белкам мембраны β -клеток, которые детектируются у более чем 80% больных диабетом данного типа.
3. Специфические антигенные мишени островковых клеток. К этой группе относятся антитела к декарбоксилазе глутаминовой кислоты, а также антиинсулиновые антитела.

В итоге, у больных значительно снижается синтез и секреция инсулина, т.е. развивается абсолютная недостаточность гормона, в связи с чем с самого начала заболевания больные нуждаются в лечении, одним из ключевых этапов которого является введение препарата инсулина [6].

Сокращение поступления глюкозы в клетку запускает альтернативные пути получения энергетических субстратов – гликогенолиз, глюконеогенез, липолиз, протеолиз. Активация липолиза ведет к расщеплению триглицеридов с образованием жирных кислот, которые активно метаболизируются по пути β -окисления. В результате возрастает содержание ацетил-КоА. Скорость его образования во много раз превышает метаболическую активность ЦТК, которая оказывается сниженной в условиях недостатка глюкозы, когда оксалоацетат используется для глюконеогенеза. В данных условиях ацетил-КоА преимущественно идет на образование кетоновых тел. Их накопление в крови приводит к развитию кетоацидоза, что вызывает изменение рН в кислую сторону, нарушает работу ферментов и может иметь летальный исход при несвоевременном лечении.

1.2.3. Причины развития сахарного диабета 2 типа

Сахарный диабет 2 типа – характеризуется относительным дефицитом секреции инсулина и проявляется снижением чувствительности к данному гормону клеток инсулинозависимых тканей.

В структуре заболевания СД2 занимает 85-90% всех случаев и наиболее часто встречается среди лиц старше 40 лет, страдающих ожирением [2]. В клинической картине преобладают сопутствующие симптомы, такие как полиурия, постоянная неутолимая жажда, неутолимый голод и другие; кетоацидоз развивается редко. Постоянно повышенный уровень глюкозы в крови со временем приводит к развитию ретинопатии, нефро- и нейропатии, микро- и макроангиопатии и других осложнений [35, 158]. При своевременном диагностировании заболевания специальная диета и физические нагрузки помогают улучшить состояние больных, что ведет к нормализации углеводного обмена, восстановлению чувствительности тканей к действию инсулина и снижению распада гликогена в печени. Это позволяет замедлить развитие заболевания, однако в дальнейшем

образование инсулина β -клетками снижается до критического уровня, что вызывает необходимость проведения заместительной гормональной терапии препаратами инсулина [36].

Основные клинические осложнения СД2 являются результатом стойкой гипергликемии, что приводит к многочисленным патофизиологическим последствиям. При повышении уровня глюкозы в крови она становится более вязкой, что затрудняет циркуляцию крови в мелких капиллярах. Сокращение циркуляции способствует прогрессированию сосудистых осложнений, ведущих к диабетической ретинопатии, периферической невропатии, плохому заживлению ран и эректильной дисфункции. В дополнение к этим основным клиническим осложнениям, происходит нарушение фильтрации глюкозы почками и выделение ее с мочой – полиурия.

На фоне постоянной гипергликемии нарастает глюкозотоксичность, что негативно сказывается на бета-клетках поджелудочной железы. По мере прогрессирования заболевания у человека проявляются некоторые симптомы дефицита инсулина, такие как похудение и кетоацидоз.

Существует тесная корреляция между ожирением и развитием СД2 с ассоциированной резистентностью к инсулину. Инсулинорезистентность представляет собой нарушение метаболического ответа на эндогенный или экзогенный инсулин. Известно, что избыточное количество свободных жирных кислот негативно влияет на рецептор-опосредованные сигнальные пути инсулина в жировой ткани, печени и скелетных мышцах. Следует отметить, что ожирение само по себе не всегда приводит к резистентности к инсулину. Так, некоторые люди, которые страдают ожирением, не испытывают резистентности к инсулину и, наоборот, люди, не страдающие ожирением, проявляют устойчивость к инсулину.

Основной причиной инсулинорезистентности является нарушение функций рецепторов инсулина на мембранах клеток. При ожирении взаимодействие рецепторов с гормоном снижается в силу изменения их

структуры или количества [12]. При этом резистентность может проявляться и на пострецепторном уровне.

Также имеет место, так называемое, нарушение раннего секреторного выброса гормона в ответ на повышение концентрации глюкозы. Так, после приема пищи, когда уровень сахара в сыворотке крови резко повышается, поджелудочная железа не секретирует инсулин. Секретция происходит уже на фоне стабильно высокого уровня глюкозы. Однако, даже несмотря на высокие концентрации инсулина, снижения уровня гликемии не происходит.

Вследствие гиперинсулинемии на клеточной оболочке снижается чувствительность и количество рецепторов, отвечающих за распознавание гормона.

Имеются сведения, указывающие на существенную роль генетических факторов в развитии резистентности к инсулину. Самым ранним подтверждением этого были исследования, проведенные во второй половине XX века, на близнецах и многодетных семьях. Было установлено, что риск развития СД₂, при наличии заболевания хотя бы у одного из родителей, составляет около 40%, а в случае, если оба родителя имеют СД₂ – до 70% [163, 227], у монозиготных близнецов риск СД достигает 58–65%, у гетерозиготных – 16–30% [77, 78].

1.2.4. Генерация активных кислородных метаболитов при развитии сахарного диабета 2 типа

К настоящему времени установлено, что ключевым механизмом в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, СД, различных видов онкологических заболеваний, хронических воспалений, аутоиммунных болезней, заболеваний нервной системы и некоторых других являются СРП. При СД, развивающийся ОС, связан с нарушением баланса между про- и антиоксидантной системой защиты. Данное состояние усиливается пониженной секрецией инсулина и инсулинорезистентностью [6].

Основной вклад в развитие ОС вносит группа соединений реактивного кислорода. В клетках аэробных организмов в норме постоянно образуются АФК. Так, при одноэлектронном восстановлении кислорода, имеющем место при функционировании электронтранспортной цепи, образуется супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$). Впоследствии $O_2^{\cdot-}$ восстанавливается до пероксида водорода (H_2O_2), который, в определенных условиях, способствует образованию гидроксильного радикала (OH^{\cdot}). Кроме того, источником АФК являются оксигеназные реакции, связанные преимущественно с функционированием ферментов семейства цитохрома Р-450, протекающие главным образом в системе митохондриального окисления. При этом не происходит полное восстановление кислорода до воды, а образуются промежуточные продукты: $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} [6]. Образование $O_2^{\cdot-}$ также происходит при аутоокислении гемоглобина в метгемоглобин. Свободные радикалы генерируются при протекании ксантиноксидазной реакции, в частности, при ишемии тканей. Увеличению продукции АФК, также, способствует взаимодействие молекулярного кислорода с ионами Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} .

Одной из ключевых причин развития ОС при СД является стойкое повышение уровня глюкозы [20]. В совокупности с подавлением активности ферментов гликолиза это приводит к активации альтернативных путей окисления глюкозы - полиолового, гексозаминового, а также неферментативного гликозилирования белков, в результате чего и генерируются свободные радикалы [7]. Аутоокисление глюкозы и ее метаболитических интермедиатов [7, 254] приводит к образованию реактивных дикарбонильных сахаров – метилглиоксаля и 3-дезоксиглюкозона. Это активирует неферментативное гликозилирование белков с последующим образованием АФК [212]. Подавление гликолиза на фоне развития патологии способствует накоплению триозофосфатов, которые могут активировать протеинкиназу С, при их превращении в α -глицерофосфат. При этом также наблюдается увеличение образования карбонильных соединений,

вовлеченных в процессы окислительной модификации белков, липидов и ДНК [28].

Установлено, что при СД увеличивается продукция $O_2^{\cdot-}$ митохондриальными клетками [66], ксантиноксидазой, цитохромом P-450, а также путем протеинкиза C-зависимой активации НАДН/НАДФН-оксидазы [125]. Кроме того, ишемия, гипоксия и псевдогипоксия различных органов и тканей, наблюдаемые при СД, могут явиться дополнительным механизмом способствующим повышенному образованию реактивных оксидантов [6].

Гиперинсулинемия является одним из важных факторов повышения ОС при диабете благодаря активации симпатической нервной системы. Это приводит к увеличению выработки катехоламинов, в результате чего возрастает генерирование свободных радикалов, как непосредственно, так и путем повышения продукции неэтерифицированных жирных кислот. [6, 205].

1.3. Ревматоидный артрит

1.3.1. Патогенез и этиология ревматоидного артрита

Ревматоидный артрит – это хроническое аутоиммунное заболевание с преимущественным поражением мелких суставов. Его распространенность достигает 0,5–1,0 % от общей численности населения. Данное заболевание представляет собой одну из серьезных социальнозначимых проблем. РА является наиболее распространенной формой воспалительного заболевания суставов. Согласно данным 2012 года в нашей стране зарегистрировано более 285 тысяч человек с диагнозом РА. Почти 90 % пациентов с агрессивной формой болезни становятся нетрудоспособными в пределах 20 лет. [37]. Основными симптомами РА являются постоянные боли в суставах воспалительного характера и прогрессирующее нарушение их функций, что приводит к снижению качества жизни пациентов и ранней инвалидности.

В основе патологических нарушений при РА лежит хроническое воспаление синовиальной оболочки суставов. Это обуславливает

пролиферацию клеток в месте повреждения, ангиогенез и разрастание соединительной ткани. В результате происходит повреждение здоровых тканей и наблюдается деформация сустава. Хроническое воспаление обусловлено активацией и пролиферацией макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, что ведет к выделению цитокинов данными клетками. В настоящее время главную роль в патогенезе РА отводят двум цитокинам: фактору некроза опухоли альфа (ФНО- α) и интерлейкину-1 β (ИЛ-1 β). Путем непосредственного воздействия на синовиальные фибробласты, хондроциты и остеокласты они способствуют прогрессированию воспалительного процесса в синовиальной оболочке, деструкции хряща и костной ткани [90, 128]. В качестве индуктора иммунного ответа также могут выступать антигеннезависимые механизмы активации Т-клеток с участием молекул CD28, CD80, CD86.

Важное место в развитии заболевания принадлежит генетическим факторам. Известно, что мутации в генах главного комплекса гистосовместимости класса 2 (HLA) ассоциированы с развитием заболевания. Так, у порядка 90% больных обнаруживаются антигены HLA-DR1 или HLA-DR4. Кроме того, имеется определенная связь между локусом HLA-DR4 и тяжестью течения РА, а также гиперпродукцией ревматоидных факторов и быстрым развитием эрозивных изменений в суставах.

Возникшие нарушения в деятельности иммунной системы приводят к образованию В-лимфоцитами агрегированных форм иммуноглобулинов G (IgG). Плазматические клетки синовиальной оболочки воспринимают данный IgG как чужеродный антиген и вырабатывают антитела – ревматоидные факторы (РФ). В результате РФ взаимодействуют с измененным IgG, что ведет к образованию иммунных комплексов. Циркулируя в крови, данные комплексы способны откладываться в тканях и вызывать их повреждение.

Для РА характерен системный характер, что проявляется в поражении не только суставов, но и мышечной ткани, кожи, почек, легких, желудочно-

кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, нервной системы, образовании ревматоидных узелков, периферической лимфаденопатии.

1.3.2. Диагностика и лечение ревматоидного артрита

В 1997 г. Американской коллегией ревматологов были предложены диагностические критерии РА, которые используются и в настоящее время. К ним относятся: утренняя скованность, артрит трех или большого количества суставов, артрит суставов кисти, симметричный артрит, ревматоидные узелки, положительный РФ в сыворотке крови, рентгенологические изменения. Высокая чувствительность и специфичность данных показателей позволила им получить широкое распространение. Диагноз РА ставится при наличии хотя бы 4 из приведенных выше критериев, при этом первые 4 критерия должны присутствовать у больного не менее 6 недель.

Одним из ключевых параметров для определения активности ревматоидного воспаления является скорость оседания эритроцитов (СОЭ). Благодаря простоте выполнения, а также наличию прочной положительной корреляционной связи между уровнем СОЭ и степенью воспалительной активности РА этот показатель остается важным лабораторным тестом.

Наряду с этим, важным диагностическим тестом является определение содержания С-реактивного белка (СРБ) – пентамерного белка плазмы крови, уровень которого возрастает в ответ на воспаление. Он принимает участие во многих иммунных реакциях. Его физиологическая роль заключается в связывании с лизофосфатидилхолином, экспрессирующимся на поверхности мертвых и умирающих клеток, что ведет к активации системы комплемента. СРБ – это, так называемый, белок острой фазы, концентрация которого в сыворотке при развитии патологического процесса, в том числе РА, может увеличиваться в десятки раз. Показатель СРБ является более чувствительным и точным диагностическим тестом, чем СОЭ. В ряде случаев, в период обострения заболевания, при нормальных показателях СОЭ содержание СРБ

значительно увеличено. Значения СРБ, наряду с другими лабораторными и клиническими данными, являются важным показателем для определения степени активности РА.

При развитии РА у больных проводят определение содержания отдельных белковых фракций в сыворотке крови – протеинограммы. На фоне развития заболевания наблюдается повышенное содержание α_2 - и γ -глобулинов, что соотносится с интенсивностью воспаления. Кроме того, увеличивается концентрация лактоферрина, трансферрина, ферритина и церулоплазмينا. При значительном повышении концентрации одной из белковых фракций проводится иммуноэлектрофоретическое исследование для исключения парапротеинемии.

Одними из важнейших маркеров аутоиммунных нарушений у больных РА являются ревматоидные факторы. Они представляют собой аутоантитела класса IgM, а также IgG, IgA, IgE и IgD изотипов, реагирующих с Fc-фрагментом IgG. Клетки, синтезирующие РФ, в основном располагаются в синовиальной оболочке, синовиальной жидкости и костном мозге. Большое значение имеет как качественный, так и количественный анализ данного показателя. Качественный анализ подтверждает диагноз РА, в то время как количественный анализ характеризует течение и прогноз заболевания. Интенсивное развитие заболевания коррелирует с высоким содержанием РФ, в то же время низкий уровень данного белка в сыворотке крови указывает на менее интенсивное прогрессирование болезни.

В настоящее время в целях предупреждения развития деструкций суставов, поддержания клинико-лабораторной ремиссии, клинического улучшения и снижения инвалидизации больных используется большой спектр препаратов. Ключевыми из них являются группа нестероидных противовоспалительных препаратов, а также глюкокортикостероиды. Нестероидные противовоспалительные препараты реализуют свое действие путем ингибирования активности циклооксигеназы (ЦОГ) – фермента, катализирующего превращение арахидоновой кислоты в простагландины,

простаглицлин и тромбоксан. Идентифицировано несколько изоформ данного фермента – ЦОГ-1, ЦОГ-2 и ЦОГ-3. Известно, что ЦОГ-2 играет важнейшую роль в синтезе простагландина E_2 , являющегося основным индуктором воспалительных изменений суставов при РА. При физиологических состояниях активность ЦОГ-2 в тканях не велика, однако, при воспалительных процессах она значительно возрастает. К данной группе препаратов относятся диклофенак, ацеклофенак, кетопрофен, напроксен и др. Глюкокортикостероиды оказывают положительное влияние на такие параметры заболевания, как выраженность суставного синдрома, длительность утренней скованности и СОЭ. Данные препараты воздействуют на эпителиальные клетки, подавляя экспрессию молекул адгезии (ELAM-1 и ICAM-1) и транскрипцию генов противовоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-8 и др.), уменьшая скорость миграции лейкоцитов в зону воспаления. Также они индуцируют синтез липокортина, подавляют активность ЦОГ-2 и экспрессию генов металлопротеиназ.

1.3.3. Интенсивность свободнорадикальных процессов при развитии ревматоидного артрита

Ведущая роль в патогенезе РА принадлежит ОС. Доказательством этого являются исследования, указывающие на наличие продуктов ПОЛ [150, 151], окисленных липопротеинов низкой плотности [103], а также увеличение содержания карбонильных групп, отражающих степень окислительного повреждения белков [103, 223] в синовиальной жидкости и ткани.

В нормальных условиях, хондроциты находятся в аваскулярной среде, и как следствие при пониженном уровне кислорода. Тем не менее, некоторые из их метаболических функций зависят от кислорода, который в основном поставляется синовиальной жидкостью. Хондроциты демонстрируют возможность обмена веществ в анаэробных условиях. В патологических

состояниях, содержание кислорода в синовиальной жидкости подвержено колебаниям вследствие ишемии-реперфузии, патологического ускорения метаболизма тканей и устойчивой деформации суставов [130]. В ответ на частые изменения парциального давления кислорода, механических нагрузок, содержания иммуномодулирующих и воспалительных медиаторов хондроциты начинают продуцировать повышенный уровень АФК [195, 222, 245].

Основными АФК, производимыми хондроцитами являются NO и $O_2^{\cdot-}$, которые генерируют производные радикалы, в том числе пероксинитрит ($ONOO^{\cdot}$) и H_2O_2 [89, 126]. NO радикал синтезируется ферментом NO-синтазой (NOS). Различают три изоформы NOS: две конститутивные (eNOS, nNOS) и одну индуцибельную (iNOS, NOS2). Хондроциты экспрессируют eNOS и iNOS. Экспрессия генов индуцируемой формы регулируется различными факторами роста, цитокинами и эндотоксинами. Образование NO стимулируется ИЛ-1 β , ФНО- α , интерфероном- γ и липополисахаридами, а также ингибируется трансформирующим фактором роста- β , ИЛ-4, ИЛ-10 и ИЛ-138 [139, 140, 236]. $O_2^{\cdot-}$ генерируется ферментным комплексом – НАДФН-оксидазой, который восстанавливает молекулярный кислород в супероксидный радикал. Данный комплекс состоит из двух мембраносвязанных пептидов p22^{phox} и gp91^{phox} и регуляторного пептида Rap1A. При активации НАДФН-оксидазы происходит транслокация через мембрану трех ее цитозольных компонентов – p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}. Суставные хондроциты экспрессируют специфические компоненты НАДФН-оксидазы, такие как p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} и gp91^{phox} [127, 191]. В присутствии ионов Fe^{2+} и H_2O_2 хондроциты генерируют OH^{\cdot} , который реагирует с ненасыщенными жирными кислотами липидов мембран, инициируя цепные реакции, что приводит к образованию других, более долгоживущих липидных радикалов.

АФК ухудшают ответную реакцию хондроцитов на факторы роста и их миграцию к месту повреждения хряща. Показано, что NO нарушает

взаимодействие между хондроцитами и внеклеточным матриксом [202], а также может ускорять апоптоз хондроцитов.

Радикалы кислорода и азота ингибируют синтез матричных компонентов, в том числе протеогликанов хондроцитами. В частности, NO и O₂ ингибируют синтез коллагена и протеогликанов, а также сульфатацию вновь синтезированных гликозаминогликанов. Кислородные радикалы могут снижать интенсивность фрагментации коллагена и усиливать сшивание коллагеновых фибрилл. Кроме того, АФК могут повреждать компоненты внеклеточного матрикса косвенно путем активации и повышения экспрессии генов матричных металлопротеиназ.

АФК непосредственно повреждают и нарушают механизмы репарации ДНК. Это повреждение может произойти в виде разрыва нитей ДНК или индивидуального повреждение нуклеотида. Показано, что уровень ключевого маркера поражения ДНК – 8-оксо-7-гидродезоксигуанозина, образующийся в реакции OH• с дезоксигуанозином - повышен в лейкоцитах и сыворотке пациентов с РА [107, 204]. NO, особенно в высоких концентрациях, вызывает дезаминирование дезоксинуклеотидов, фрагментацию двуцепочечной ДНК и модификацию азотистых оснований метаболически активированными N - нитрозаминами, что может привести к развитию соматических мутаций.

Важным маркером окислительного стресса является митохондриальная ДНК. Ее повреждение, в условиях нарушения процессов репарации на фоне прогрессирования заболевания, приводит к потере митохондриями своих функций, а также задержке клеточного роста [256]. Это, вероятно, связано с близостью митохондриальной ДНК к АФК, в том числе продуктам перекисного окисления липидов, генерируемых липидами внутренней митохондриальной мембраны, которые содержат компоненты дыхательной цепи переноса электронов. Кроме того, при РА увеличивается содержание внеклеточный митохондриальной ДНК в синовиальной жидкости и плазме [107].

Окисление липидов, вероятно, способствует ускоренному развитию атеросклероза при РА [88, 104, 154]. Стойкое местное и системное повышение воспалительных цитокинов способствует липолизу и системному высвобождению свободных жирных кислот, что способствует дислипидемии, наблюдаемой при РА. ОС, возникающий при воспалительных реакциях приводит к местному окислению липопротеинов низкой плотности. Это способствует дальнейшему прогрессированию воспалительных изменений, в том числе местному повышению уровня молекул адгезии и хемокинов. Также, окисленные липопротеины низкой плотности в больших количествах поглощаются моноцитами, в результате чего формируются пенистые клетки, которые были обнаружены в синовиальной жидкости [103] и синовиальной оболочке [219] больных РА.

1.4. Система защиты организма от действия свободных радикалов

Повысить защитно-приспособительные возможности организма от разрушающего действия свободных радикалов способна антиоксидантная система организма. Первоначально к веществам антиоксидантам относили химические соединения, которые непосредственно взаимодействуют с токсическими радикалами и нейтрализуют их. В настоящее время к антиоксидантам относят все те соединения, которые в той или иной степени могут снижать интенсивность СРП [40]. Наряду с антиоксидантной функцией данные вещества препятствуют накоплению токсичных продуктов окисления, способны изменять активность других регулирующих систем, участвуют в различных видах обмена веществ, участвуют в построении структурных элементов клетки [3]. В самом общем плане систему защиты тканей и клеток от токсических метаболитов кислорода и продуктов ПОЛ можно разделить на физиологическую и биохимическую. Физиологическая включает в себя механизмы регуляции доставки и поступления кислорода к клеткам. Данный компонент АОС поддерживает баланс между

интенсивностью поступления кислорода к клеткам и скоростью его метаболизации в тканях.

К биохимическому компоненту относится собственно АОС организма, включающая химические соединения, непосредственно взаимодействующие с АФК и продуктами их превращений, а также вещества, предотвращающие возможность генерации АФК в процессе окислительного фосфорилирования или митохондриального окисления [1].

1.4.1. Ферментативное звено антиоксидантной системы

1.4.1.1. Супероксиддисмутаза и каталаза

Супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1) ключевой антиоксидантный фермент, действие которого направлено на восстановление $O_2^{\cdot-}$ до H_2O_2 . СОД является металлопротеином. Активный центр фермента может включать различные металлы: медь и цинк, марганец, железо, никель. В зависимости от конформации белка и металла-кофактора различают три основных семейства СОД:

1. Cu/Zn-СОД. В состав активного центра входит атом меди и цинка.
2. Mn-СОД. Данный тип фермента содержит только атомы магния или только атомы железа.
3. Ni-СОД. В качестве кофактора выступают атомы никеля.

В настоящее время у млекопитающих были идентифицированы три различных изоформы СОД. Две изоформы фермента содержат в активном центре Cu и Zn и локализованы внутриклеточно (Cu,Zn-СОД или СОД1) или внеклеточно (ЕС-СОД или СОД3). СОД1 – гомодимер, имеет молекулярную массу порядка 32 кДа и был обнаружен в цитоплазме, ядре и лизосомах [81, 82, 93, 187]. СОД3 существует в виде гомотетрамера с молекулярной массой 135 кДа и имеет высокое сродство к гепарину [159]. СОД3 был впервые обнаружен в человеческой плазме, лимфе, асците и спинномозговой жидкости [160, 161]. Экспрессия СОД3 ограничена определенным типом

клеток и тканей, где ее уровень может превосходить СОД1 и СОД2. Другая изоформа СОД содержит марганец в качестве кофактора и локализована в митохондриях клеток аэробных организмов (Mn-СОД или СОД2) [252]. Данный фермент существует в виде гомотетрамера с молекулярной массой около 90 кДа [243]. Было показано, что СОД2 играет важную роль в процессах клеточной дифференцировки и образовании опухолей [105], а также в защите от гипероксия-индуцированной легочной токсичности [129].

Реакция, катализируемая СОД, протекает в две стадии. Вначале от первой молекулы $O_2^{\cdot -}$ отщепляется электрон и передается на металл активного центра фермента. В результате этого образуется свободная молекула O_2 . Затем дополнительный электрон переносится на вторую молекулу супероксида, который протонируется с образованием пероксида водорода.

Полное восстановление H_2O_2 , образовавшегося в ходе реакции, катализируемой СОД, до воды осуществляет фермент каталаза (КФ 1.11.1.6). Данный фермент состоит из четырех идентичных субъединиц. Полипептидная цепь, каждой из них, состоит более чем из 500 аминокислот и содержит одну геммовую группу, которая и позволяет ферменту реагировать с H_2O_2 . Оптимум рН для каталазы человека приблизительно равен 7 и имеет достаточно широкие границы (скорость реакции существенно не меняется при рН от 6,8 до 7,5). [48]

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

Кроме того, каталаза способна катализировать окисление, с участием H_2O_2 , различных метаболитов и токсинов, таких как метанол, этанол, муравьиная кислота, фенолы.

Данный фермент, как правило, находится в пероксисомах. [185] В клетках растений пероксисомы участвуют в фотодыхании и симбиотической фиксации азота. Каталаза обнаружена у подавляющего большинства известных организмов практически в каждом органе, причем особенно высокие концентрации приходится на печень.

Активности каталазы и СОД коррелируют между собой, что может быть связано с переключением потока электронов с одной цепи транспорта на другую. В этих условиях СОД и каталаза действуют как звенья одной системы утилизации кислорода, размещенные в разных участках клетки.

1.4.1.2. Глутатионовое звено антиоксидантной системы и НАДФН-генерирующие ферменты

Другим важным компонентом антиоксидантной системы организма является глутатионовое звено, которое обеспечивает защиту от органических и неорганических гидроперекисей, а также детоксикацию ксенобиотиков. В состав данной системы входит несколько типов ферментов и низкомолекулярный антиоксидант – глутатион.

Глутатион – это трипептид γ -глутамилцистеинилглицин, являющийся наиболее распространенным низкомолекулярным тиолом клетки. Глутатион – один из основных растворимых антиоксидантов в клетке, играющий важную роль в защите организма от болезней, токсинов, вирусов, неблагоприятного воздействия окружающей среды, излучений и окислительного стресса [233].

Глутатион широко распространен в растительном и животном мире [41]. При этом у животных наибольшая его концентрация обнаружена в печени и хрусталике. В меньших количествах глутатион содержится в

почках, лейкоцитах, селезенке, адипоцитах, головном мозге, коже, эритроцитах и слизистой кишечника. В плазме его содержание примерно на 2-3 порядка меньше, чем в клетках.

Помимо защитной, глутатион выполняет ряд других физиологических функций. Например, выступает в качестве резерва цистеина, воздействуя на лимфоциты, обеспечивает иммунный ответ организма, а также оказывает влияние на биохимические превращения витаминов С, Е и липоевой кислоты.

Синтез GSH катализируется последовательно двумя цитозольными ферментами γ -глутамилцистеинсинтетазой и глутатионсинтетазой [153]. Благодаря наличию остатка цистеина глутатион легко окисляется, в том числе неэнзиматически, под действием электрофильных веществ с образованием окисленного глутатиона (GSSG). Внутриклеточная концентрация GSH заметно уменьшается в ответ на белковую недостаточность, окислительный стресс и многие патологические состояния [122, 153]. GSH/ GSSG является основной окислительно-восстановительной парой клетки, которая зависит от соотношения НАДФН / НАДФ⁺ и уровня окисленного и восстановленного тиоредоксина [142].

Глутатион участвует во многих клеточных реакциях. Во-первых, GSH эффективно удаляет свободные радикалы и другие активные формы кислорода (ОН[•], LOO[•], ONOO⁻, H₂O₂) как непосредственно, так и косвенно, путем ферментативных реакций [108]. В таких реакциях, GSH окисляется с образованием GSSG, который затем восстанавливают до GSH в НАДФН-зависимой реакции, катализируемой глутатионредуктазой.

Во-вторых, GSH реагирует с различными электрофильными, физиологическими метаболитами (эстроген, меланины, простагландины, лейкотриены) и ксенобиотиками (бромбензол и ацетаминофен) с образованием меркаптанов [108]. Эти реакции инициируют ГТ.

В-третьих, GSH конъюгирует с NO с образованием S-нитрозоглутатионового аддукта, который расщепляется тиоредоксиновой системой [108].

В-четвертых, GSH служит в качестве субстрата для формальдегиддегидрогеназы, которая преобразует формальдегид и GSH в S-формил-глутатион [247]. Удаление формальдегида имеет физиологическое значение, поскольку он синтезируется при метаболизме метионина, холина, метанола (под действием алкогольдегидрогеназы), саркозина (посредством саркозин оксидазы) и ксенобиотиков (с помощью цитохром P450-зависимой монооксигеназной системы эндоплазматической сети).

Важно отметить, что смещение редокс уровня GSH / GSSG в сторону окислительных состояний активирует несколько сигнальных путей, тем самым снижая пролиферацию клеток и увеличивая апоптоз [231].

Наряду со способностью непосредственно связывать радикалы, глутатион выступает в качестве субстрата для протекания глутатионпероксидазной реакции.

Глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) – широко распространённое семейство ферментов, которые обладают пероксидазной активностью и защищают организм от оксидативного повреждения. Вместе с пероксиредоксином они относятся к классу тиоловых пероксидаз и катализируют восстановление H_2O_2 и органических гидропероксидов до воды и соответствующих спиртов, снижая тем самым их токсичность [94]. ГП является Se-содержащим ферментом, что в значительной мере определяет его антиоксидантные свойства. В настоящее время у млекопитающих на основании сходства последовательности, консервативных участков, биохимических функций и особенности каталитической триады, которая включает селеноцистеин / цистеин, глутамин, и триптофан, идентифицировано 7 изоформ данного фермента.

Первый член этого семейства белков – ГП1 – был обнаружен в качестве глутатион-зависимого антиоксидантного фермента, защищающего

гемоглобин от окислительного повреждения [182]. Наибольший уровень данного фермента обнаруживаются в тканях с высоким уровнем генерации пероксида водорода, к которым относятся эритроциты, печень, почки и легкие [109].

Различают также ГП2, которая была обнаружена в желудочно-кишечном тракте и ГП3 – являющуюся секретлируемым белком [220]. ГП4 является единственным членом семейства, проявляющим свою активность в отношении мембраносвязанных гидропероксидов [101, 249] и играющим решающую роль в сперматогенезе [214, 239]. Субклеточная локализация ГП4 зависит от различных промоторов [92], которые контролируют экспрессию трех различных транскриптов, кодирующих цитозольную [215], митохондриальную [136] и ядерную формы [133, 221].

ГП5 является первой обнаруженной изоформой не содержащей селен. Данный фермент обнаружен в эпидидимисе как секретлируемый белок [50].

Шестой член суперсемейства – ГП6 – был обнаружен в обонятельном эпителии [87]. Особенностью данной изоформы является наличие в активном центре фермента у человека селеноцистеина, тогда как у мышей и крыс присутствует цистеин [72].

Еще одной изоформой, обнаруженной у млекопитающих, является ГП7 [132]. Она обладает достаточно низкой активностью, но при этом известно, что ГП7 участвует в снижении окислительного стресса в клетках рака молочной железы.

По структуре ГП1, -2, -3, -5 и -6 являются гомотетрамерами. В тоже время ГП4 и ГП7 имеют мономерную структуру [94, 102]. Различие между этими двумя группами прослеживается еще на уровне первичной аминокислотной последовательности, что может также объяснять различную субстратную специфичность.

Восстановление окисленного глутатиона катализирует глутатионредуктаза (КФ 1.8.1.7) – фермент, являющийся флавопротеином – содержащим ФАД в качестве простетической группы. Фермент представляет

собой гомодимер с молекулярной массой около 104 кДа, при этом в каждой субъединице выделяют 3 домена: НАДФН-связывающий, ФАД-связывающий и домен димеризации. Каждый мономер содержит 478 остатков аминокислот и одну молекулу ФАД. ГР является термостабильным белком, сохраняя свою функцию при температуре 65°C [98, 196].

Действие ГР реализуется через две последовательные стадии: восстановительную и окислительную. Вначале, НАДФН восстанавливает ФАД, что приводит к образованию ФАДН⁻ аниона. Этот анион затем быстро разрушает дисульфидную связь между Cys58 – Cys63, образуя короткоживущий ковалентносвязанный комплекс переноса электронов между флавином и Cys63. При этом высвобождается НАДФ⁺ и впоследствии заменяется новой молекулой НАДФН. На окислительной стадии Cys63 нуклеофильно взаимодействует с GSSG, что приводит к образованию смешанной дисульфидной связи (GS-Cys58) и GS⁻ аниона. His467 ГР затем протонирует GS⁻ анион с высвобождением первой молекулы GSH. Далее, происходит восстановление дисульфида Cys58 – Cys63 с высвобождением второго GSH, образующегося за счет Glu472 [70].

Показано, что функционирование ГР не является обязательным условием для выживания некоторых аэробных организмов, включая человека [184, 248]. Данное обстоятельство, вероятно, связано с тем, что большинство прокариот и эукариот имеют альтернативные резервные системы, которые поставляют электроны со скоростью, достаточной для поддержания достаточного количества GSH и физиологически приемлемого GSH / GSSG соотношения.

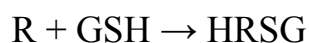
Помимо ГП и ГР – ферментов осуществляющих редокс цикл глутатиона – в данную систему входит большое суперсемейство ферментов глутатионтрансфераз. Ферменты данной группы обладают пероксидазной активностью в отношении органических гидропероксидов [131]. Наряду с этим, действие данных ферментов направлено на детоксикацию ксенобиотиков путем их конъюгирования с GSH, что проявляется в их

способности нейтрализовать α , β - ненасыщенные альдегиды и кетоны [64], а также канцерогенные эпоксиды [47].

Суперсемейство подразделяется на три типа ферментов: цитозольные, митохондриальные и микросомальные.

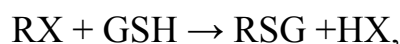
Цитозольные ГТ составляют самое большое семейство. По структуре это гомо- и гетеродимеры, субъединицы которых состоят из 199-244 аминокислотных остатков. На основе сходства аминокислотных последовательностей у млекопитающих выделяют 7 классов, включающие 16-18 изоформ. Все эти формы кодируются разными генами [110, 124, 198]. Некоторые ГТ ассоциированы с мембранами [216]. Огромное множество реакций, осуществляемых ГТ, можно разделить на 4 основных типа [24].

1. Присоединение к субстрату (R) полной молекулы GSH:



Так протекают реакции GSH с алкенами, особенно α , β -ненасыщенными карбонилами, например, с 4-гидроксиалк-2-еналями и эпоксидами.

2. Нуклеофильное замещение:



где уходящая группа представлена X^- , Hal^- , NO_2^- , HSO_4^- , RO^- , RS^- , CN^- . Эта реакция протекает по электрофильному атому С (1-хлор-2,4-динитробензол), N (тринитроглицерин), S (незаряженные дисульфиды типа 5,5'-дитио-бис-2-нитробензоата), P (метилпаратион).

3. Восстановление органических гидро- и эндопероксидов до спиртов:



Реакции данного типа характерны для восстановления различных гидропероксидов (ROOH) полиненасыщенных жирных кислот, фосфолипидов и простагландинов. При этом на H_2O_2 ГТ не действует. Восстановление происходит и во многих реакциях первого и второго типов, например, с эпоксидами, нитратными эфирами и дисульфидами.

4. Изомеризация. В реакциях данного типа образуется промежуточный комплекс с GSH.

Митохондриальная ГТ также является димером и образована остатками 226 аминокислот. Она может восстанавливать гидропероксид кумола и (S)-15-гидроперокси-5,8,11,13-эйкозотетраеновую кислоту. Данный фермент присутствует в митохондриях и пероксисомах. У мышей митохондриальная ГТ высоко активна в печени, почках, желудке и сердце. У человека активность фермента обнаружена практически во всех органах [115]. Ферменты данного класса подобны бактериальным дисульфидизомеразам, что предполагает независимую эволюцию от цитозольной ГТ [198].

Микросомальные ГТ – мембран-ассоциированные белки, участвующие в метаболизме эйкозаноидов и глутатиона. Ферменты данной группы осуществляют детоксикацию ксенобиотиков и обладают антипероксидазной и изомеразной активностью. Микросомальные ГТ играют очень важную роль в воспалительных процессах.

Ключевыми поставщиками восстановительных эквивалентов в виде НАДФН для протекания реакции восстановления глутатиона являются реакции катализируемые Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.49) – цитозольный фермент, катализирующий первую реакцию пентозофосфатного пути с образованием 6-фосфоглюконолактона и НАДФН. Фермент состоит из 515 остатков аминокислот и имеет молекулярную массу 59,3 кДа.

Г6ФДГ человека находится в состоянии динамического равновесия между димерной и тетрамерной формами. Высокие значения рН и ионной силы способствует диссоциации тетрамера на димеры, в то время как понижение рН и ионной силы при наличии двухвалентных катионов смещает равновесие в сторону тетрамеров.

Изоцитратдегидрогеназа катализируют окислительное декарбоксилирование изоцитрата в α -кетоглутарат и восстановление НАД(Ф)⁺ до НАД(Ф)Н.

Это группа ферментов, принадлежащих к двум различным подклассам, один из которых использует НАД⁺ в качестве акцептора электронов, а другой НАДФ⁺. Известно три изоформы ИДГ. Одна из них является НАД⁺ - зависимым ферментом и локализована в митохондриях. Она является ключевым ферментом ЦТК. Две другие – НАДФ⁺ - зависимые, при этом одна из них является митохондриальной, а другая преимущественно цитозольной, но также присутствует и в пероксисомах [210]. НАДФ⁺ – ИДГ представляет собой гомодимер. У дрожжей фермент является поставщиком восстановительных эквивалентов для реакций β-окисления полиненасыщенных жирных кислот в пределах пероксисом, в частности для восстановления 2,4-диеноил-СоА в 3-еноил-СоА [209]. У высших эукариот β-окисление протекает в митохондриях, что объясняет присутствие НАДФ-ИДГ в данных органеллах. Фермент также защищает клетки от АФК, образующихся в процессе окисления липидов и других процессов [183]. В гепатоцитах млекопитающих ИДГ генерирует НАДФН для синтеза жирных кислот и холестерина пероксисомами. При этом экспрессия фермента активируется и регулируется специфическими белками, связывающими стеролрегулирующие элементы – SREBP [135].

Несмотря на то, что НАДФ-ИДГ играет важную роль в защите организма от ОС, сам фермент достаточно легко инактивируется путем окисления. Этот процесс, вероятно, опосредован модификацией фермента путем глутатионилирования, под действием высоких уровней GSSG [118], S-нитрозилирования, под действием NO [137] и неферментативного гликозилирования, в присутствии высоких концентраций глюкозы [119].

1.4.2. Неферментативное звено антиоксидантной системы

1.4.2.1. Водорастворимые низкомолекулярные антиоксиданты

К низкомолекулярным антиоксидантам относится многочисленная группа соединений, способных предотвращать окислительное повреждение путем прямого и косвенного взаимодействия с АФК [145]. Косвенный механизм предполагает хелатирование ионов металлов с переходной валентностью, что ведет к ингибированию реакции Хабера-Вайса. При прямом действии данные соединения выступают в качестве доноров электронов. Это приводит к восстановлению кислородных радикалов и защите внутриклеточных соединений от разрушения.

Низкомолекулярные антиоксиданты обладают рядом преимуществ по сравнению с группой ферментативных антиоксидантов. Обладая сравнительно небольшими размерами молекул, они способны проникать через клеточные мембраны и располагаться в непосредственной близости от биологической мишени. Клетка может регулировать их концентрацию. Они обладают широким спектром активности по отношению к различным АФК. Данные антиоксиданты поступают как из эндогенных источников, при протекании биосинтетических процессов, так и экзогенным способом с пищей.

В процессе тушения активных молекул сами антиоксиданты окисляются, формируя радикал-антиоксиданта, который не является реактивным. В дальнейшем этот радикал может быть окислен или регенерирован с использованием определенного восстановителя.

Несмотря на то, что антиоксиданты имеют решающее значение для поддержания клеточных функций, сама клетка производит ограниченное число низкомолекулярных антиоксидантов. При этом ни один из них, синтезированных эндогенно, не может считаться исключительно антиоксидантом. Они обладают рядом других важных биологических функций. В связи с этим большинство низкомолекулярных антиоксидантов

поступают в организм с пищей. Несмотря на то, что люди во всем мире потребляют различные продукты, которые отличаются друг от друга и содержат различные антиоксиданты, процессы, регулирующие антиоксидантную активность клеток, одинаковы. Таким образом, общая антиоксидантная активность схожа при потреблении различных продуктов, хотя уровень конкретных соединений может различаться.

Низкомолекулярные антиоксиданты по их растворимости можно разделить на водорастворимые и жирорастворимые.

Аскорбиновая кислота, один из важнейших водорастворимых антиоксидантов, который может быть синтезирован растениями и некоторыми животными. Люди, приматы, морские свинки и летучие мыши утратили фермент, необходимый для его синтеза и полностью зависят от его поступления с пищей. Подобно другим антиоксидантам аскорбат, который при физиологическом рН существует как моноанион, обладает многими биохимическими функциями. Он выступает в качестве кофактора для многих ферментов, таких как пролилгидроксилаза и дофамин- β -гидроксилаза.

Антиоксидантная активность аскорбата проявляется в его способности отдавать 2 электрона, восстанавливая и нейтрализуя АФК. При отщеплении одного электрона, он превращается в аскорбил-радикал, который в дальнейшем может быть окислен с получением дегидроаскорбата. Аскорбил-радикал является относительно стабильным и может регенерировать в восстановленную форму путем присоединения электрона от другого восстановительного агента, такого как GSH или НАДН, посредством фермента НАДН-семидегидроаскорбатредуктазы. Продукт окисления, дегидроаскорбиновая кислота, также можно регенерировать с помощью фермента дегидроаскорбатредуктазы за счет 2 молекул GSH.

Аскорбат способен нейтрализовать большинство известных АФК. Также он способен восстанавливать окисленный токоферол. Однако функции аскорбата в настоящее время до конца не определены. Наряду с антиоксидантной известна и его прооксидантная активность. Так, при

взаимодействии с ионами трехвалентного железа может образовываться OH^\bullet [123].

Одним из наиболее важных антиоксидантов в плазме крови является мочева кислота. Она синтезируется из гипоксантина и ксантина под действием ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы [60]. При физиологических условиях мочева кислота присутствует в виде иона, что и определяет ее антиоксидантные свойства. Мочева кислота проявляет активность в отношении OH^\bullet , RO_2^\bullet , $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , ONOO^- и оксигемоглобина, образующегося при протекании процессов ПОЛ [123]. Она также связывает ионы металлов, таких как медь и железо, снижая интенсивность СРП [56]. Показано, что мочева кислота может также предотвращать деградацию СОДЗ [201].

К группе низкомолекулярных антиоксидантов относятся также гистидиновые дипептиды, синтезируемые в мозге и скелетной мускулатуре. В данную группу входит карнозин, гомокарнозин и анзерин [53]. Они считаются мультифункциональными антиоксидантами, так как они эффективны в отношении большинства АФК. *In vivo* они уменьшают окислительное повреждение при различных нарушениях, включая ишемические. В дополнение к этому гистидиновые дипептиды не оказывают прооксидантного эффекта [238].

1.4.2.2. Жирорастворимые низкомолекулярные антиоксиданты

Примером липофильных антиоксидантов является витамин Е – токоферол. Это группа антиоксидантов, способных ингибировать процессы ПОЛ. Известно восемь природных веществ – членов семейства витамина Е. Эти соединения имеют 3 асимметрических атома углерода, давая 8 оптических изомеров. Наиболее эффективной формой является α -токоферол. После взаимодействия с радикалами, токоферол преобразуется в токоферолхинон и впоследствии токоферилхинон. Как было отмечено выше,

токоферол способен восстанавливаться в активную форму под действием аскорбиновой кислоты.

Токоферолы также выступают в качестве мембран-стабилизирующих агентов. Наряду с этим, в присутствии переходных металлов способны проявлять прооксидантные свойства [113, 226, 237].

В группу липофильных антиоксидантов также входит витамин А. Это обширная группа веществ, которая включает ретинол, ретиналь, ретиновую кислоту и каротиноиды, наиболее важным из которых является β -каротин [74].

Витамин А способен непосредственно нейтрализовать АФК, а также косвенно, путем ингибирования транскрипции гена индуцибельной NO-синтазы в различных тканях, что ведет к уменьшению выработки оксида азота [250]. Антиоксидантное действие каротиноидов связано с инактивацией $^1\text{O}_2$. При поглощении данной АФК каротиноиды переходят в триплетное состояние, а затем рассеивают свою энергию за счет вращательных и колебательных взаимодействий с растворителем [146]. Они также способны нейтрализовать продукты ПОЛ. Показано, что каротиноиды способны снижать количество свободных радикалов тремя способами: непосредственно присоединять радикалы, путем переноса электрона и отщепления протона [147]. Кроме того, имеются сообщения, что продукты, содержащие каротиноиды, защищают ротовую полость, глотку, гортань и пищевод от развития рака.

Сравнительно недавно антиоксидантные свойства были обнаружены у α -липоевой кислоты, которая играет существенную роль в митохондриальных дегидрогеназных реакциях. Липоат вступает в реакцию с АФК, такими как $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , HOCl , RO_2^{\cdot} , $^1\text{O}_2$. Липоевая кислота также защищает мембраны, взаимодействуя с витамином С и GSH. В дополнение к антиоксидантной активности, восстановленная форма данной кислоты – дигидролипоат – может оказать прооксидантное действие посредством восстановления железа. В ряде модельных экспериментов было показано, что

введение α -липоевой кислоты положительно влияет на состояние окислительного метаболизма. В частности, при таких заболеваниях как ишемические, нейродегенеративные и лучевые поражения, диабет, образование катаракты. Кроме того, липоат может функционировать как редокс-регулятор белков, таких как миоглобин, пролактин и тиоредоксин [207].

1.5. Характеристика мелатонина

1.5.1. Синтез мелатонина в организме

Мелатонин является широко распространенным веществом и синтезируется большинством живых организмов, включая одноклеточных, грибы, растения и животных. У человека и других позвоночных животных мелатонин синтезируется эпифизом, сетчатой оболочкой глаза, клетками диффузной эндокринной системы пищеварительного тракта (хромоаффинными клетками печени) и др.

Мелатонин, или N-ацетил-5-метокситриптамин, впервые был выделен из экстракта бычьей шишковидной [141]. Данный гормон проявляет множество функций в том числе регулятора ритмов, снотворную, антиоксидантную, онкостатическую, иммунорегулирующую [177].

В организме человека мелатонин синтезируется из триптофана. Под действием фермента триптофангидроксилазы триптофан превращается в 5-гидрокситриптофан, который декарбоксилируется с образованием серотонина. Синтез мелатонина из серотонина катализируется двумя ферментами - арилалкиламин N-ацетилтрансферазой и гидроксииндол-O-метилтрансферазой. Первый из них преобразует серотонин в N-ацетилсеротонина, который, в конечном счете, превращается в мелатонин под действием второго фермента [55].

Шишковидная железа млекопитающих является нейроэндокринным преобразователем. Информация об освещенности передается от сетчатки на

эпифиз через супрахиазматическое ядро гипоталамуса и симпатическую нервную систему. Нейроны передают железе сигнал в виде норэпинефрина, что приводит к выделению мелатонина. Синтез и секреция мелатонина стимулируется в темноте и тормозится на свету. В дневное время суток клетки фоторецепторов сетчатки гиперполяризованы, что ингибирует высвобождение норадреналина [111]. С наступлением темноты, фоторецепторы начинают выделять норадреналин, тем самым активируя всю систему, что приводит к увеличению $\alpha 1$ и $\beta 1$ адренорецепторов эпифиза [208]. Это ведет к увеличению активности арилалкиламин N-ацетилтрансферазы в 30-70 раз и, как следствие, увеличивается синтез и выделение мелатонина.

Сразу после синтеза гормон поступает в кровь путем пассивной диффузии. В организме человека секреция мелатонина возрастает вскоре после наступления темноты, с пиком в середине ночи (от 2 до 4 часов утра). Концентрации мелатонина в сыворотке значительно различаются в зависимости от возраста. У детей моложе трех месяцев мелатонин секретируется в следовых количествах. Пик секреции гормона приходится на 4 и 7 летний возраст, при этом его уровень может достигать 325 пг/мл [54]. В дальнейшем уровень гормона постепенно снижается и к 15-18 годам выходит на уровень взрослого организма – 10-60 пг/мл. Данная концентрация остается стабильной в зрелом возрасте, но к старости начинает постепенно снижаться [80].

Существуют три основных пути метаболизации мелатонина:

1. Классический, печеночный путь деградации, в результате которого образуется 6-гидроксимелатонин [83].
2. Альтернативный, индольный путь, с образованием 5-метоксииндол уксусной кислоты или 5-метокситриптофола [121].
3. Кинураминовый путь, конечным продуктом которого является N1-ацетил-N2-формил-5-метилкинурамин (АФМК) [172].

В классическом пути деградации мелатонина цитохром P450 печени метаболизирует мелатонин до 6-гидроксимелатонина [181], который затем конъюгируется с остатками серной и глюкуроновой кислот и выводится с мочой. Экскреция с мочой 6-гидроксимелатонин сульфата тесно коррелирует с концентрацией мелатонина в сыворотке крови [86]. В печени данный гормон может также подвергаться деметилированию с образованием N-ацетилсеротонина [83].

Эффекты мелатонина опосредуются в основном через связывание с мембранными рецепторами, относящихся к семейству G-белков. Известно два различных класса мембранных рецепторов – MT1, кодируемый геном MTNR1A, и MT2, кодируемый геном MTNR1B [189]. При этом они имеют до 55% гомологии, а мембранные домены – до 70% [186]. Подобно многим другим G-белок-сопряженным рецепторам, рецепторы мелатонина потенциально способны к гликозилированию по их внеклеточному N-концевому участку, а также, подобно протеинкиназе C, казеинкиназе и протеинкиназе A, к фосфорилированию по C-концевому участку, находящемуся на внутренней стороне мембраны [97].

MT1 рецептор связан с различными группами G-белка, которые опосредуют ингибирование аденилатциклазы и активацию фосфолипазы C. Кроме того, связываясь с рецепторами данного типа, мелатонин оказывает ингибирующее воздействие на цАМФ-зависимый путь, благодаря снижению активности протеинкиназы A и фосфорилирования ядерного фактора CREB [96]. MT1 рецепторы экспрессируются в клетках головного мозга, сердечно-сосудистой системы (в том числе периферических кровеносных сосудах, аорте и сердце), иммунной системы, семенниках, яичниках, коже, печени, почках, коре надпочечников, плаценте, сетчатке глаз, поджелудочной железе и селезенке [167, 217]. В головном мозге, рецептор экспрессируется преимущественно в гипоталамусе, мозжечке, гиппокампе, черной субстанции и вентральной области покрышки.

MT2 рецептор связан со многими сигнальными путями, включая продукцию фосфоинозиотида, ингибирование аденилатциклазы и торможение гуанилатциклазного пути. Данный тип рецепторов обнаружен в клетках иммунной системы, головного мозга (гипоталамус, супрахиазматическое ядро), сетчатки глаза, кровеносных сосудов, семенников, почек, желудочно-кишечного тракта, молочных желез, жировой ткани и кожи.

В дополнение к этим рецепторам был идентифицирован, так называемый, MT3 рецептор мелатонина. Он обладает более низкой аффинностью к мелатонину и имеет 95% гомологию с человеческой хинон-редуктазой 2 – цитозольным ферментом, который катализирует восстановление хинонов, таких как менадион и кофермент Q [134, 200].

Мелатонин также является лигандом для ретиноид-зависимых орфарных ядерных рецепторов [218]. Кроме того, он взаимодействует с внутриклеточными белками, такими как кальмодулин, кальретикулин, тубулин [68] и препятствует связыванию Ca^{2+} с кальмодулином [61]. Эти взаимодействия, вероятно, связаны с некоторыми физиологическими эффектами мелатонина, однако достоверных подтверждений этому пока не получено.

1.5.2. Биологическая роль в организме

Одной из важнейших функций мелатонина является антиоксидантная. Он способен как непосредственно, так и косвенно нейтрализовать свободные радикалы, тем самым снижать интенсивность ПОЛ и деградацию ДНК.

Известно, что мелатонин обладает значительно большей эффективностью, чем большинство его естественных аналогов [180]. Он способен непосредственно нейтрализовать $OH\cdot$, H_2O_2 , $NO\cdot$ и др. [112]. Продукты окисления мелатонина не могут быть восстановлены и выводятся из организма [192]. Данный гормон является антиоксидантом широкого спектра действия и способен активировать цитопротекторные ферменты

[225]. Некоторые из защитных эффектов мелатонина обусловлены его метаболитом – АФМК [197].

Показано, что при острых состояниях, таких как сепсис, асфиксия и хирургических вмешательствах, введение мелатонина приводило к снижению содержания малонового диальдегида, воспалительных цитокинов и соотношения нитрат/нитритов. На фоне хронической невропатии, наблюдаемой при болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и боковом амиотрофическом склерозе, мелатонин способствовал подавлению апоптоза нейронов. Побочных эффектов при использовании дозы в диапазоне 1-300 мг / день отмечено не было [75, 224, 251].

Противовоспалительные свойства мелатонина основаны на его способности блокировать транскрипционные факторы, которые активируют провоспалительные цитокины и ингибируют ЦОГ2 и iNOS, которые активируются при хронических воспалительных расстройствах [166, 177].

Имеются данные, что степень образования и прогрессирования опухоли может снижаться при выделении мелатонина в кровь или внеклеточную жидкость [188]. При введении в физиологических и фармакологических концентрациях, мелатонин обладает эффектом ингибирования роста MCF- и эстроген-позитивных линий клеток рака молочной железы. Исследования на культуре клеток показали, что эффекты мелатонина опосредуются повышением уровня глутатиона [188]. Противоопухолевый эффект мелатонина продемонстрирован и в отношении рака печени, что, по-видимому, является результатом MT1 /MT2-зависимого ингибирования поглощения жирных кислот, в частности линолевой, что предотвращает образование ее митогенного метаболита - 13-гидроксиоктадекадиеновой кислоты [63]. Также, мелатонин оказывает онкостатические эффекты на клеточные линии рака яичников [242], рака эндометрия [91], опухоли предстательной железы [178] и кишечника [52]. Несмотря на то, что во многих экспериментах *in vivo* и *in vitro* мелатонин

оказывает онкостатическое действие, в некоторых моделях он способствует росту опухоли [51].

Помимо этого, мелатонин обладает иммуномодулирующим свойством. Показано, что ингибирование синтеза мелатонина приводит к ослаблению клеточного и гуморального ответов у мышей [156]. Известно, что введение данного гормона препятствует развитию вторичных иммунодефицитов, вызванных стрессом или лекарствами и защищает мышей от вируса энцефалита [157]. Мелатонин защищает кроветворные клетки-предшественники от токсического действия химиотерапевтических препаратов [155], усиливает выработку ИЛ-2 и ИЛ-6 культивируемыми мононуклеарными клетками [170] и ИЛ-2 и ИЛ-12 макрофагами [164]. Наличие специфических мелатонин-связывающих сайтов в лимфоидных клетках указывает на прямое влияние мелатонина на регуляцию иммунной системы [106].

Перспективным представляется использование мелатонина при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, в качестве монотерапии или в комбинации с другими лекарственными средствами. Несколько экспериментов на животных показали влияние данного гормона на функции кровообращения посредством различных механизмов. Антиоксидантные свойства мелатонина улучшают функцию эндотелия путем поддержания доступности оксида азота, тем самым оказывая влияние на вазодилатацию и снижение артериального давления [234]. К тому же, данный гормон способен уменьшить адренергический и повысить холинергический тонус [73]. Эти данные вместе с идентификацией MT1 и MT2 рецепторов мелатонина в левом желудочке, аорте, коронарных, церебральных и системных периферических артериях [240], наряду с данными о развитии сердечно-сосудистых заболеваний у лиц с измененным циркадным ритмом, подтверждают гипотезу о возможной фармакологической роли гормона в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, таких как гипертония, ишемия миокарда и инсульт.

Показано регулирующее влияние мелатонина на изменение массы тела. Так, ежедневное введение мелатонина уменьшает размер жировой ткани в области брюшины и содержание лептина в плазме у крыс [84]. Кроме того, в экспериментах на крысах, показано, что мелатонин может предотвращать некоторые из побочных эффектов ожирения, в том числе снижение чувствительности к инсулину [179]. Эти результаты свидетельствуют о том, что снижение секреции мелатонина, ассоциированное со старением, может приводить к повышению массы тела, ожирению и связанным с ними метаболическими последствиями [85].

1.5.3. Вещества, корригирующие уровень мелатонина

1.5.3.1. Мелаксен

Наиболее распространенным мелатонин-корригирующим препаратом является мелаксен. По своей структуре мелаксен является синтетическим аналогом гормона эпифиза – мелатонина. Он синтезирован из аминокислот растительного происхождения. Основное его действие проявляется в нормализации биологических ритмов, оказании адаптогенного, седативного и снотворного действий, адаптации организма к быстрой смене часовых поясов. Также данный препарат способствует нормализации ночного сна (ускоряет засыпание, улучшает качество сна, снижает число ночных пробуждений, улучшает самочувствие после утреннего пробуждения, не вызывает ощущения вялости, разбитости и усталости при пробуждении, сновидения становятся более яркими и эмоционально насыщенными).

Установлено, что мелаксен благотворно влияет на интеллектуально-мнестические функции мозга и эмоционально-личностную сферу, снижает стрессовые реакции, увеличивая концентрацию гамма-аминомасляной кислоты и серотонина в среднем мозге и гипоталамусе, изменяя активность пиридоксалькиназы [32].

Выявлено, что мелаксен проявляет иммуностимулирующие и антиоксидантные свойства. Обладает протективными свойствами в отношении свободно-радикального повреждения ДНК и протеинов, тормозит процессы ПОЛ. Способствует стимулированию продукции интерлейкинов и γ -интерферона лимфоцитами. Способствует замедлению процессов патологических изменений клеток, принимает участие в регуляции противоопухолевого иммунитета. За счет ритмрегулирующего, иммуномодулирующего и антиоксидантного действия способен тормозить процессы старения клеток. Замедляет секрецию гонадотропина и, в меньшей степени, других гормонов аденогипофиза – кортикотропина, тиреотропного и соматотропного гормонов [4].

1.5.3.2. Эпифамин

Мелатонин-корректирующей активностью, также, обладает эпифамин – препарат, полученный из шишковидной железы крупного рогатого скота и представляющий собой комплекс белков и нуклеопротеидов, которые обладают избирательным действием на клетки эпифиза. В клинической практике эпифамин применяется для нормализации гормонального обмена, иммуномодуляции и регулирования системы свертывания крови, а также для поддержания функции эндокринной системы у пожилых людей. Данный препарат может применяться при лечении ряда онкологических больных, в основном, при раке молочной железы и шейки матки. Эпифамин применяют для стимуляции иммуно- и гемопозеза, а также подготовки к последующему комплексному лечению. У пациентов с гормонзависимыми опухолями на фоне лучевой и химиотерапии эпифамин стимулирует кроветворение и иммунитет, что снижает риск инфекционных и других осложнений. Использование эпифамина также является весьма перспективным направлением в терапии бронхиальной астмы, сахарного диабета, сердечно-

сосудистых заболеваний и патологий, сопровождающихся развитием психовегетативных расстройств [26, 42].

1.5.3.3. Вальдоксан

Нарушения сна являются характерной особенностью депрессии. Антидепрессанты, которые в том числе являются эффективными корректорами нарушений сна, могут являться наиболее перспективными при лечении депрессивных расстройств [149]. Предполагается, что идеальный антидепрессант должен не только ускорять засыпание и утреннее пробуждение, но также способствовать чувству бодрости и концентрации внимания в течение дня [148]. К таким веществам можно отнести агомелатин – вальдоксан.

Вальдоксан – нафталинсодержащее соединение, являющееся селективным агонистом МТ1 и МТ2 мелатониновых рецепторов, а также антагонистом 5-НТ_{2С} рецепторов серотонина [241]. При этом он не обладает сродством к мускариновым, гистаминергическим, адренергическим и дофаминергическим рецепторам [65]. В организме человека период полураспада вальдоксана больше, чем у мелатонина и составляет более 2 ч. Он метаболизируется в печени тремя изоферментами цитохрома Р450 – СУРА1, СУРА2 и СУР2С9. Основными метаболитами вальдоксана являются 3-гидрокси-, 3-гидрокси-, 7-метокси-, 7-десметил- и дигидродиолвальдоксан.

Вальдоксан обладает выраженной антидепрессивной активностью. Это, вероятно, связано с особенностями экспрессии мелатониновых рецепторов МТ 1 и МТ 2 и 5-НТ_{2С} рецепторов в супрахиазматическом ядре и других областях мозга, участвующих в патофизиологии депрессии, а именно коре головного мозга, гиппокампе, миндалевидном теле и таламусе. Эти рецепторы (МТ 1, МТ 2 и 5-НТ_{2С}) демонстрируют циркадные колебания и регулируются степенью освещенности и биологическими часами [162]. Воздействие вальдоксана на эти рецепторы способствует ресинхронизации

нарушенных циркадных ритмов и фаз сна, что может быть эффективно в лечении депрессивных состояний, включая клиническую депрессию, пограничное расстройство личности и сезонное аффективное расстройство [144].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Для проведения исследования были отобраны самцы белых лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.), полученные в питомнике лабораторных животных расположенном по адресу Воронежская область, деревня Медовка, ул. Студенческая, д. 16. Животные были разделены путем стратифицированной рандомизации со стратификацией по массе тела и возрасту. В исследование были включены крысы массой 150-200 г. в возрасте 3-5 месяцев. При проведении исследований соблюдалась основные принципы Надлежащей лабораторной практики (GLP). Работа выполнена в соответствии с санитарными правилами для вивария и нормами гуманного обращения с лабораторными животными.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Создание модели сахарного диабета 2 типа у крыс

Развитие СД2 было индуцировано внутримышечными инъекциями протамина-сульфата (Sigma-Aldrich Co., США) на протяжении трех недель в дозе 10 мг/кг массы тела животного в объеме 0,5 мл физ. р-ра, 3 раза в сутки [44].

В ходе исследования было сформировано тринадцать экспериментальных групп: 1 группа (n = 16) – контрольные животные; 2 группу (n = 16) составляли животные с СД2; в 3, 4 и 5 группах (n = 18) животным с СД2 внутрибрюшинно вводили эпифамин в виде раствора в 1 мл 0,9% NaCl утром в дозах 1,25, 2,5 и 5,0 мг/кг на 15, 17 и 19 день эксперимента; в 6, 7, 8 и 9 группах (n = 16) животным по аналогичной схеме вводили мелаксен в дозах 2,5, 5,0, 10,0 и 20,0 мг/кг; в 10, 11, 12 и 13 группах

(n = 16) по аналогичной схеме вводили вальдоксан в дозах 2,5, 5,0, 10,0 и 20,0 мг/кг. Через три недели после начала введения протамина-сульфата наркотизированных животных всех экспериментальных групп усыпляли и забирали кровь, печень, почки и сердце для дальнейших исследований.

2.2.2. Создание модели ревматоидного артрита у крыс

Экспериментальный РА вызывали путём подкожного введения 100 мкл полного адьюванта Фрейнда (Sigma-Aldrich Co., США) в подушечку лапки [244]. Инъекцию осуществляли однократно. Для подтверждения развития РА использовали биомаркеры патологии: измерение РФ и СОЭ.

В ходе эксперимента было дополнительно сформировано еще 5 экспериментальных групп: 14-ю группу (n = 17) составляли животные с РА, вызванным введением адьюванта Фрейнда; в 15 и 16 группах (n = 16) животным с патологией внутрибрюшинно вводили эпифамин в дозе 1,25 и 2,5 мг на 1 кг массы животного, в виде раствора в 1 мл 0,9% NaCl, однократно утром на 10, 12 и 14 день эксперимента; крысам 17 и 18 групп (n = 16) по аналогичной схеме вводили мелаксен в дозе 5,0 и 10,0 мг на кг. На 15 день эксперимента после введения адьюванта Фрейнда у наркотизированных животных забирали кровь и участок мышечной ткани.

2.2.3. Подготовка материала для исследования

Печень перед извлечением из брюшной полости перфузировали *in situ* ледяным 0,9% раствором NaCl через *v. portae*. Затем ее гомогенизировали с использованием гомогенизатора Daihan HG-15A в 4х-кратном объеме охлажденной среды выделения, которая содержала: 50 мМ трис-HCl-буфер, pH 7,6 (Диа-М, Россия), 10 мМ ЭДТА (Вектон, Россия), 0,5 мМ 2-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich Co., США).

Почки, после промывания ледяным физиологическим раствором, извлекали у животных и осушали фильтрованной бумагой. Затем гомогенизировали в 3,5х-кратном объеме охлажденной среды выделения.

Сердце извлекали у животных после многократного промывания ледяным физиологическим раствором. Промытое сердце осушали фильтрованной бумагой и гомогенизировали в 3х-кратном объеме охлажденной среды выделения.

Участок икроножной мышцы извлекали у животных и помещали в ледяной физиологический раствор. После этого ткань осушали фильтрованной бумагой, взвешивали и гомогенизировали в 5-кратном объеме охлажденной среды выделения.

Вытяжку тканей, полученную в результате гомогенизации, фильтровали через слой капрона, размер ячеек которого составлял 0,1 мм. Не разрушенные клетки, обломки клеток и ядра отделяли центрифугированием при 5 тыс. об/мин в течение 10 мин. После этого, осадок отбрасывали, а супернатант использовали для определения исследуемых параметров.

Венозную кровь собирали в стеклянную пробирку без добавления антикоагулянта и выдерживали в течении 30 мин в термостате при температуре 37°C. По прошествии указанного времени собирали и центрифугировали супернатант при 4 тыс. об/мин в течение 10 мин. Затем отбирали сыворотку и использовали для дальнейших исследований.

2.2.4. Определение уровня глюкозы в сыворотке крови

Контроль развития СД2 осуществляли путем определения концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс. Для проведения анализа использовали набор реактивов «Глюкоза-02/12/32» (производитель ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн», СПб, Россия). Забор крови осуществляли из хвостовой вены на 15, 17 и 19 день эксперимента [10] в пробирки типа Eppendorf без антикоагулянта, которые помещали на 10-15 мин в термостат

при температуре 37°C. Сыворотку крови получали центрифугированием при 2,5 тыс. об/мин в течение 5 минут.

2.2.5. Определение содержания ревматоидного фактора

Содержание РФ определяли в сыворотке крови крыс турбидиметрическим методом с помощью приборов Cobas 6000 ("F. Hoffmann-LaRocheLtd", Швейцария) и CobasIntegra 400 ("F. Hoffmann-LaRocheLtd", Швейцария) [14].

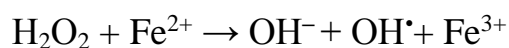
2.2.6. Определение скорости оседания эритроцитов

СОЭ крови крыс определяли по методу Панченкова [30]. В калиброванный на 100 делений капилляр Панченкова набирали до метки «Р» 5%-ный раствор цитрата натрия и вносили его на часовое стекло. После чего в тот же капилляр набирали двукратно кровь до метки «К» и оба раза выдували ее на часовое стекло. Тщательно смешанную кровь с цитратом натрия, вновь набирали в капилляр до метки «К». Капилляр оставляли в штативе в вертикальном положении. СОЭ определяли через 1 час и выражали в миллиметрах.

2.2.7. Оценка оксидативного статуса

2.2.7.1. Определение интенсивности биохемилюминесценции

Интенсивность процессов СО определяли методом БХЛ индуцированной сульфатом железа и пероксидом водорода. Данный метод основан на каталитическом разложении H_2O_2 ионами металла с переходной валентностью – Fe^{2+} , по реакции Фентона:



При этом образуются свободные радикалы ($R\cdot$, $OH\cdot$, $RO\cdot$, $RO_2\cdot$, $O_2^{\cdot-}$), которые взаимодействуют с исследуемым биологическим субстратом, инициируя процесс СО. Рекомбинация радикалов $RO_2\cdot$ приводит к образованию неустойчивого тетроксидов, распадающегося с выделением кванта света. Интенсивность СРП определяли на приборе БХЛ-07 с программным обеспечением. Кинетическую кривую БХЛ регистрировали в течение 30 секунд и определяли следующие параметры: светосумму хемиллюминесценции (S), интенсивность вспышки (I_{max}), отражающие интенсивность СРП, и величину тангенса угла наклона кривой ($tg\alpha_2$), характеризующую общую антиоксидантную активность. На скорость протекания данного процесса влияет большой комплекс соединений, обладающих как антиоксидантными, так и прооксидантными действиями, то есть метод дает возможность оценить уровень компенсаторных механизмов СРП в организме.

Среда для измерения интенсивности БХЛ содержала следующие компоненты: 0,4 мл 0,1М калий-фосфатного буфера, рН 7,5 (Вектон, Россия), 0,4 мл 0,01мМ $FeSO_4$ (Вектон, Россия), 0,2 мл 2% раствора H_2O_2 (вносимого непосредственно перед измерением). Исследуемый образец вносили в количестве 0,1 мл перед добавлением раствора H_2O_2 .

2.2.7.2. Определение содержания диеновых конъюгатов

Содержание ДК определяли на спектрофотометре Hitachi U-1900 при 233 нм. Принцип метода основан на том, что при протекании процессов ПОЛ на этапе генерации АФК в молекулах полиненасыщенных жирных кислот возникает система сопряженных двойных связей, что сопровождается появлением максимума в спектре поглощения при 233 нм [43].

Ход определения: 125 мкл исследуемого материала разбавляли равным объемом 0,9% NaCl. Затем добавляли по 1,5 мл гептана (Вектон, Россия) и изопропилового спирта (Вектон, Россия). Пробы центрифугировали в

течение 10 мин при 3 тыс. об/мин. 1мл супернатанта переносили в новые пробирки и добавляли 100 мкл дистиллированной воды. Перемешивали и отбирали 0,5 мл гептановой фазы в новые чистые пробирки. Приливали 2,5 мл этилового спирта и фотометрировали против контроля – 96% этанол.

Уровень ДК в гомогенате тканей определяли по формуле:

$$C = \frac{V_{\text{общ}} \times D \times 10^6}{L \times m \times V_{\text{внес}} \times 2,2 \times 10^5}$$

Содержание ДК в сыворотке рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{D \times 10^6}{L \times V_{\text{внес}} \times 2,2 \times 10^5}$$

где С – концентрация ДК, мкМ/г (мкМ/мл, для сыворотки); $V_{\text{общ}}$ – объём полученного образца, мл; D – величина оптической плотности, ед.; L – длина оптического пути, см; $2,2 \times 10^5$ – коэффициент молярной экстинкции, $M^{-1}c^{-1}$; $V_{\text{внес}}$ – объём вносимой пробы, мл.

2.2.7.3. Определение степени фрагментации ДНК

2.2.7.3.1. Выделение тотальной ДНК

Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «К-Сорб» (Синтол, Россия). Для исследования были использованы образцы печени, почек и сердца 1, 2, 4, 8 и 12-ой групп животных, а также участки мышечной ткани 1, 14, 16 и 18-ой групп.

Для экстракции ДНК в 1,5 мл пробирки типа Eppendorf вносили 200 мкл исследуемого материала, 10 мкл протеиназы К и 200 мкл лизирующего раствора. Перемешивали содержимое на вортексе и инкубировали при температуре $65^{\circ}C$ в течение 15 минут, периодически перемешивая содержимое пробирок. Краткосрочно центрифугировали для осаждения капель смеси с крышки и стенок пробирки.

Затем добавляли 200 мкл осаждающего раствора и перемешивали. Капли с крышек сбрасывали краткосрочным центрифугированием. Весь

объем смеси переносили на колонку и центрифугировали 1 мин при 8 тыс. об/мин.

Промывали колонку последовательно добавляя 400 мкл промывочного раствора 1, 400 и 200 мкл промывочного раствора 2. После нанесения каждого раствора смесь центрифугировали как описано выше.

Очищенный препарат ДНК получали путем нанесения на колонку элюирующего раствора, прогретого до 70°C, и центрифугирования в течении 1 мин при 8 тыс. об/мин.

2.2.7.3.2. Электрофорез ДНК

Фрагментацию ДНК оценивали с помощью электрофореза образца ДНК в 1,5% агарозном геле. В качестве буфера для электрофореза использовали 1-кратный трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ) буфер, который готовили следующим образом: смешивали 2,42 г трис, 0,186 г ЭДТА, 200 мл стерильной дистиллированной воды и добавляли уксусную кислоту до тех пор, пока значение рН не достигнет 7,6. Затем, полученный раствор доводили стерильной дистиллированной водой до 500 мл. Буфер для нанесения был приготовлен на основе 1-кратного ТАЕ и содержал 40% сахарозы и 0,25% бромфенолового синего. В качестве маркеров молекулярной массы использовали набор «MassRuler» производства «Fermentas», включающий маркеры от 100 до 10000 нуклеотидных пар.

Электрофорез проводили следующим образом. Для приготовления 1,5% геля растворяли 450 мг агарозы в 30 мл ТАЕ и нагревали раствор до полного расплавления агарозы. После охлаждения раствора до 60°C добавляли бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Раствор перемешивали и выливали в кювету для геля. Вертикально вставляли гребенки так, чтобы зубцы не доставали до дна 1,5 мм. Гель застывал в течение 30 минут, а затем кювету с гелем помещали в электрофоретическую камеру. Заполняли камеру однократным ТАЕ и извлекали гребенки.

Образцы исследуемой и маркерной ДНК подготавливали к электрофорезу, путем их смешивания с буфером для нанесения. Затем в лунки осторожно вносили по 10 мкл образцов ДНК. Электрофорез проводили при 100 В в течение 1-2 часов. Просматривали гель в УФ-свете на трансиллюминаторе и фотографировали.

2.2.7.4. Определение активности каспаз

Определение активности каспаз-3 и -8 проводили с помощью набора реактивов Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric и Caspase 8 Assay Kit, Colorimetric («BioVision», США) в соответствии с прилагаемыми протоколами. Колориметрический анализ активности каспаз основан на гидролизе пептидного субстрата ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-п-нитроанилида (в случае каспазы 3) и ацетил-Pe-Glu-Thr-Asp-п-нитроанилида (в случае каспазы 8) с образованием п-нитроанилина, имеющего максимум поглощения при 405 нм (молярный коэффициент поглощения = 10.5). Активность каспаз выражали в пикомолях продукта, образующегося в 1 мин, в расчете на 1 мг белка. Для эксперимента использовали образцы печени, почек и сердца 1, 2, 4 и 8-ой групп животных, а также участки мышечной ткани 1, 14, 16 и 18-ой групп.

2.2.8. Измерение активности ферментов

Активность ферментов в тканях исследуемых животных представляли в виде удельной активности, Е на грамм сырой массы и Е на мл сыворотки. Единицу активности (Е) рассчитывали, как количество фермента, катализирующее превращение 1 мкМ субстрата за 1 мин при температуре 25°C. Определение активности ферментов проводили на спектрофотометре Hitachi U-1900 с программным обеспечением.

2.2.8.1. Определение активности ферментов, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАДФ.

О скорости ферментативных реакций, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАДФ, судили по изменению оптической плотности при 340 нм. Расчет активностей ГП, ГР, Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ производили по следующей формуле:

$$E = \frac{D \times V \times 1,0}{\Delta V \times t \times 6,22}$$

где D – изменение оптической плотности за промежуток времени t при длине волны 340 нм; 1,0 – объем раствора, находящегося в кювете, мл; V – общий объем ферментного раствора, мл; ΔV – объем пробы, вносимый в кювету, мл; t – промежуток времени измерения, мин; 6,22 – молярный коэффициент экстинкции для дегидрогеназ, число равно значению поглощения, которую дает 1 мл раствора, содержащий 1 мкмоль кофермента, при спектрофотометрировании с толщиной поглощающего слоя измеряемого раствора 1 см.

2.2.8.1.1. Определение активности глутатионпероксидазы

Скорость ГП-реакции определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Снижение оптической плотности в ходе реакции является результатом окисления НАДФН в НАДФ. Это становится возможным благодаря протеканию двух сопряженных реакций: генерации GSSG под действием ГП и его последующего восстановления под действием ГР с использованием НАДФН в качестве кофермента. Среда для измерения активности ГП содержала следующие компоненты: 50 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7,4 (Вектон, Россия) содержащий 1 мМ ЭДТА (Вектон, Россия), 0,12 мМ НАДФН (AppliChem GmbH, Германия), 0,85 мМ GSH (Carl Roth

GmbH + Co. KG, Германия), 0,37 мМ Н₂О₂, 1 ед/мл ГР (Sigma-Aldrich Co., США). Контрольная проба не содержала восстановленный глутатион.

2.2.8.1.2. Определение активности глутатионредуктазы

Скорость ГР-реакции определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Снижение оптической плотности в ходе реакции является результатом окисления НАДФН в НАДФ, протекающего за счет реакции восстановления глутатиона под действием фермента. Измерение активности ГР проводили в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,4 (Вектон, Россия), содержащем 1мМ ЭДТА (Вектон, Россия), 0,16 мМ НАДФН (AppliChem GmbH, Германия) и 0,8 мМ GSSG (Carl Roth GmbH + Co. KG, Германия).

2.2.8.1.3. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

Об активности Г6ФДГ судили по увеличению оптической плотности опытных образцов при длине волны 340 нм, наблюдаемому при образовании 6-фосфоглюконолактона из глюкозо-6-фосфата в результате восстановления НАДФ. Среда спектрофотометрирования Г6ФДГ представляла собой 50мМ трис – НСl – буфер, рН 7,8 (Диа-М, Россия), содержащий 3,2 мМ глюкозо-6-фосфата (Sigma-Aldrich Co., США), 0,25 мМ НАДФ (AppliChem GmbH, Германия), 1,0 мМ МnСl₂ (Вектон, Россия). Реакцию начинали внесением ферментного препарата в среду.

2.2.8.1.4. Определение активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы

Скорость окислительного декарбоксилирования изоцитрата, катализируемого НАДФ-ИДГ, рассчитывали по возрастанию оптической плотности в результате восстановления НАДФ. Среда для измерения

активности НАДФ – ИДГ содержала следующие компоненты: 50 мМ трис – HCl-буфер, pH 7,8 (Диа-М, Россия), содержащий 1,5 мМ изоцитрата (Sigma-Aldrich Co., США), 2 мМ MnCl₂ (Вектон, Россия), 0,4 мМ НАДФ (AppliChem GmbH, Германия).

2.2.8.2. Определение активности глутатионтрансферазы

О скорости ГТ-реакции судили по возрастанию оптической плотности опытных образцов при 340 нм. Определение активности фермента проводили с субстратом 1-хлор, 2,4-динитробензолом.



Среда для измерения активности ГТ содержала следующие компоненты: 0,1 М калий-фосфатный-буфер, pH 7,4 (Вектон, Россия), содержащий 1 мМ ЭДТА (Вектон, Россия), 1 мМ 1-Cl-2,4-динитробензол, 5 мМ GSH (Carl Roth GmbH + Co. KG, Германия).

Расчет активности глутатионтрансферазы производили по формуле:

$$E = \frac{D \times V \times 1,0}{\Delta V \times t \times 9,6}$$

где D – прирост оптической плотности за промежуток времени t при $\lambda=340$ нм; 1,0 – объем раствора, находящегося в кювете, мл; V – общий объем ферментного раствора, мл; ΔV – объем пробы, вносимый в кювету, мл; t – промежуток времени измерения, мин; 9,6 – молярный коэффициент экстинкции для глутатион-динитробензола, численно равный значению поглощения, которую дает 1 мл раствора, содержащий 1 мкмоль конъюгата, при спектрофотометрировании при толщине поглощающего слоя измеряемого раствора 1 см.

2.2.8.3. Определение активности аконитатгидратазы

Активность АГ определяли спектрофотометрически при 233 нм. В ходе АГ – реакции происходило разложение цитрата, что способствовало росту оптической плотности в результате образования двойной связи в молекуле цис-аконитата. Для определения активности АГ использовали среду следующего состава: 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 7,8 (Диа-М, Россия), содержащий 0,15 мМ цитрат (Вектон, Россия). Реакцию начинали добавлением аликвоты ферментного препарата в спектрофотометрическую среду. Количество Е рассчитывали по формуле:

$$E = \frac{D \times V \times V_1}{\Delta V \times t \times \varepsilon}$$

где D – изменение оптической плотности пробы за промежуток времени t; V – общий объём ферментного раствора, мл; V₁ - объём раствора, находящегося в кювете, мл; ΔV - объём пробы, вносимый в кювету, мл; t - время измерения активности фермента, мин; ε – молярный коэффициент экстинкции для хромофорной группы субстрата, отражающий изменение оптической плотности при окислении или восстановлении 1 мкМ субстрата в 1 мл среды (для цис-аконитата – 3,08).

2.2.8.4. Определение активности супероксиддисмутазы

Активность СОД определяли на спектрофотометре при λ=540 нм. Определение активности проводили по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия в неэнзимотической системе феназинметасульфата и НАДН [31].

Среда для измерения активности СОД содержала следующие компоненты: 0,1 М калий-фосфатный-буфер, рН 7,8 (Вектон, Россия); содержащий 0,33 мМ ЭДТА (Вектон, Россия); 0,41 мМ НСТ (Thermo Fisher Scientific Inc., США); 0,01 мМ ФСМ (AppliChem GmbH, Германия); 0,8 мМ

НАДН (AppliChem GmbH, Германия). Субстрат добавляли из расчёта 0,03 мл на 1 мл среды инкубации. Реакцию запускали добавлением НАДН, регистрировали прирост оптической плотности в течение 5 минут.

За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимого для 50% ингибирования восстановления НСТ. Расчёт вели по формуле:

$$\frac{100 - \frac{E_o \times 100}{E_k}}{50 \times [\text{мг белка}]}$$

где E_o и E_k - среднее значение прироста экстинкции за 5 минут соответственно в опытной и контрольной пробах.

2.2.8.5. Определение активности каталазы

Активность каталазы определяли спектрофотометрически при длине волны $\lambda=410$ нм. В основе метода лежит способность H_2O_2 образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс [34].

Реактивы, необходимые для определения активности каталазы: 0,08% раствор H_2O_2 ; 4,5% раствор аммония молибденовокислого (Вектон, Россия); 0,1 М трис-НСl-буфер, рН 7,4 (Диа-М, Россия); буферно-субстратная смесь (10 мл трис-НСl-буфера рН 7,4+30 мл 0,08% H_2O_2)

Таблица 1. Ход определения активности каталазы

	Контроль	Опыт	Примечание
Буферно-субстратная смесь	2 мл	2 мл	10 минут при 37 ⁰ С
Гомогенат	–	0,1 мл	3 минуты при 37 ⁰ С
Молибдат аммония	2 мл	2 мл	–
Гомогенат	0,1 мл	–	–

Расчет результата

$$A = \frac{(E_k - E_o) \times 1,0 \times 10^4 \times 4,1 \times 10^6}{22,2 \times 10^6 \times 3}$$

4,1 – конечный объем пробы;

$1,0 \times 10^4$ фактор разведения;

10^6 – коэффициент пересчета на мкм;

$22,2 \times 10^6$ – коэффициент молярной экстинкции H_2O_2 ;

3 минуты – время инкубации.

2.2.9. Определение содержания компонентов неферментативной антиоксидантной системы.

2.2.9.1. Определение концентрации восстановленного глутатиона

Содержание GSH определяли с помощью реакции его взаимодействия с 5,5- дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой (реактив Элмана) (Sigma-Aldrich Co., США). В ходе данной реакции в эквимольных количествах образуется тионитрофенильный анион, имеющий максимум поглощения при 412 нм [13].

Ход определения:

1. 2,0 мл супернатанта, разведенного в 8 раз 0,1М фосфатным буфером pH 7,4 (Вектон, Россия), наливали в центрифужные пробирки и добавляли 1,0 мл 20% трихлоруксусной кислоты (Вектон, Россия). Пробы перемешивали и охлаждали в холодильнике 15 – 20 минут.

2. Затем пробы центрифугировали 15 минут при 3 тыс. об/мин;

3. В новые чистые пробирки наливали по 0,5 мл фосфатного буфера (Вектон, Россия) и в каждую добавляли по 1,0 мл надосадочной жидкости;

4. В опытную пробирку №1 приливали 0,05 мл реактива Элмана, а в контрольную пробирку №2 – 0,05 мл $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Содержимое пробирок хорошо перемешивали;

5. Измеряли оптическую плотность опытной и контрольной проб против фосфатного буфера при $\lambda=412$ нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Содержание GSH рассчитывали по следующей формуле:

$$C = \frac{E_{\text{оп}} - E_{\text{к}}}{13,1 \times 10^3} \times 72,6 \times 10^3$$

где C – концентрация GSH, мМ; $E_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы; E_k – оптическая плотность контрольной пробы; $13,1 \cdot 10^3$ – коэффициент молярной экстинкции реактива Элмана при 412 нм; $72,6 \cdot 10^3$ – фактор разведения.

2.2.9.2. Определение содержания цитрата

Определение содержания цитрата проводили по методу Нательсона. В основе метода лежит образование пентабромацетона при взаимодействии цитрата с $KMnO_4$ и KBr , его последующая экстракция петролейным эфиром и определение оптической плотности раствора, содержащего окрашенный комплекс с тиомочевинной при $\lambda=430$ нм [5]. Расчёт производили по калибровочной кривой.

В центрифужной пробирке смешивали 0,5 мл исследуемой жидкости и 0,5 мл 17%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (Вектон, Россия). Центрифугировали 10 минут при 4 тыс. об/мин. Отбирали 0,5 мл супернатанта в новые пробирки и приливали к нему 0,25 мл 50% раствора H_2SO_4 (Вектон, Россия), 0,1 мл 1М KBr (Вектон, Россия) и 0,05 мл насыщенного раствора $KMnO_4$ (Вектон, Россия). Смесь перемешивали и оставляли в холодильнике на 20 минут. Затем по каплям добавляли 3% раствор H_2O_2 для удаления избытка $KMnO_4$. Экстракцию образовавшегося пентабромацетона проводили петролейным эфиром (Вектон, Россия). Для проведения цветной реакции в новой пробирке смешивали 1 мл эфирного экстракта с 2,5 мл 2%-ного раствора тиомочевины в боратном буфере (Вектон, Россия). Содержимое пробирки перемешивали в течение 5 минут и после расслоения фаз окрашенный в светло-жёлтый цвет нижний слой фотометрировали на спектрофотометре Hitachi U-1900 при 430 нм. Определение оптической плотности проводили против контрольной пробы, которая вместо исследуемого образца содержала 0,5 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты.

2.2.10. Унифицированный метод определения содержания общего белка по биуретовой реакции

Метод основан на том, что в щелочной среде белки реагируют с CuSO_4 с образованием соединения, окрашенного в фиолетовый цвет.

Используемые реактивы:

1. 154 мМ NaCl (Вектон, Россия).
2. Биуретовый реактив (Вектон, Россия).
3. 0,2 М NaOH (Вектон, Россия).
4. 30 мМ KI в 0,2 М NaOH (Вектон, Россия).
5. Калибровочный раствор альбумина из человеческой сыворотки, 100 г/л (Диа-М, Россия).
6. Рабочий раствор биуретового реактива: к 20 мл биуретового реактива добавляют 80 мл 30 мМ раствора KI.

Ход определения. В пробирку наливали 5 мл рабочего раствора биуретового реактива и добавляли 0,1 мл исследуемого образца. Раствор перемешивали и через 30 мин фотометрировали опытную пробу против контрольной при $\lambda=540$ нм. В качестве контроля использовали пробу, которая вместо исследуемого образца содержала NaCl.

Количество белка рассчитывали по калибровочному графику, для построения которого из калибровочного раствора альбумина готовили рабочие растворы с различной концентрацией белка (табл. 2). Затем 100 мкл каждого рабочего калибровочного раствора смешивали с 5 мл биуретового реактива. Через 30 мин все пробы фотометрировали против контрольной при

Таблица 2. Приготовление рабочих калибровочных растворов белка

№ раствора	Основной калибровочный раствор альбумина, мл	Изотонический раствор NaCl, мл	Концентрация белка, г/л
1	0,4	0,6	40
2	0,6	0,4	60
3	0,8	0,2	80
4	1,0	-	100

540 нм. По полученным данным строили график зависимости величины оптической плотности от концентрации белка. Калибровочный график линеен до значения оптической плотности 0,5, а при более высоких значениях сыворотку разводят изотоническим раствором NaCl в соотношении 1:1 [33].

2.2.11. Определение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов.

2.2.11.1. Выделение тотальной РНК

Уровень транскриптов генов антиоксидантных ферментов определяли в тканях крыс 1, 2, 4, 8, 12, 14, 16 и 18-ой групп. Выделение суммарной клеточной РНК производили с использованием набора "РНК-Экстран" (Синтол, Россия) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Качество выделенной РНК оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, содержащем бромистый этидий в концентрации 0,5 мкг/мл, и последующей визуализации на трансиллюминаторе при длине волны 365 нм. Определение концентрации РНК проводили на спектрофотометре Hitachi – U1900 при длине волны 260 нм.

2.2.11.1. Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция

Для синтеза первой цепи комплементарной ДНК использовали рекомбинантную обратную транскриптазу вируса мышинового лейкоза Молони – М-MuLV. В качестве затравочного праймера использовали олиго-(dT)₁₅ праймер, что позволяет избирательно перевести в форму ДНК только молекулы информационной РНК, представляющих собой транскрипты работающих генов. С целью предотвращения деградации молекул РНК в реакционную смесь вносили ингибиторы РНКаз. Синтез кДНК проводили при температуре 42°C в течение 40 минут. Инактивацию М-MuLV ревертазы

осуществляли путем прогрева пробирок при 92°C в течение 5 минут. Полученные в ходе обратной транскрипции продукты использовали для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Для амплификации определенных участков генов был разработан комплект генспецифических праймеров, с использованием программного обеспечения «Genamics Expression». Специфичность отжига праймеров проверяли с помощью программы «Blast» (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/). Праймеры по предоставленным последовательностям были синтезированы фирмой ЗАО «Синтол» (Россия).

Таблица 3. Праймеры генов, использованных для проведения ПЦР

Обозначение транскрипта	Прямой праймер	Обратный праймер
SOD1	GGTCCAGCGGATGAA GAG	GGACACATTGGCCAC ACC
CAT	GCTAATGAAGACAAC GTCACCTCA	TGTTCTCACACAGGC GTTTC
GPX1	CGACATCGAACCCGA TATAGA	ATGCCTTAGGGGTTG CTAGG
GSR	TTCCTCATGAGAACCA GATCC	TGAAAGAACCCATC ACTGGTTA
GAPDH	CCCTCAAGATTGTCAG CAATG	AGTTGTCATGGATGA CCTTGG

Для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I использовали набор реактивов фирмы «Синтол» (Россия). В качестве матрицы использовали кДНК, полученную на предыдущем этапе. Исследование проводили на приборе АНК – 32. Схема проведения анализа была следующая: первоначальный прогрев смеси в течении 3 минут при 95°C, затем 40 циклов, состоящих из этапов денатурации (95°C – 15 секунд), отжига праймеров (60°C – 15 секунд) и элонгации (72°C – 30 секунд). После окончания ПЦР-РВ анализировали значения пороговых циклов. Для исключения ложноположительных результатов одновременно с исследуемыми образцами проводили амплификацию отрицательно-контрольных образцов: а) на загрязнение компонентов наборов чужеродной

ДНК; б) на чистоту условий подготовки образцов для амплификации. Реакционная смесь отрицательного контроля имела тот же состав, что и опытные образцы, только вместо исследуемого образца ДНК вносили соответствующий объем воды. Уровень транскриптов исследуемых генов оценивали относительно гена «домашнего хозяйства» - глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (GAPDH). Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов осуществляли с применением $2^{-\Delta\Delta C_t}$ метода [152].

2.3. Статистическая обработка экспериментальных данных

Опыты проводили в 16-18-ти кратных биологических повторностях. Аналитические повторы были проведены дважды для каждой пробы. Для проверки гипотезы о соответствии распределения полученных вариантов нормальному распределению использовали критерий Колмогорова - Смирнова в модификации Лиллиефорса. Результаты исследования обрабатывали с использованием показателей описательной статистики: выборочного среднего (\bar{X}), выборочного стандартного отклонения (s), стандартной ошибки среднего ($s_{\bar{X}}$) по следующим формулам:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}; s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1}}; s_{\bar{X}} = \frac{s}{\sqrt{n}},$$

где X – значение параметра,

n – объем выборки,

s – выборочное стандартное отклонение.

Полученные результаты опытных образцов сравнивали с контролем. В таблицах и на рисунках представлены данные как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Результаты эксперимента анализировали с использованием t-критерия Стьюдента с расчетом среднего значения, стандартного отклонения. Достоверно различающимися считали значения для которых $p < 0,05$ [29].

ГЛАВА 3. ВОЗДЕЙСТВИЕ ЭПИФАМИНА, МЕЛАКСЕНА И ВАЛЬДОКСАНА НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

3.1. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на уровень гликемии у крыс при сахарном диабете 2 типа

Основным клиническим показателем развития как СД1, так и СД2 является стойкое повышение уровня гликемии, что является основной причиной развития диабетических осложнений, таких как ретинопатия, нефропатия, инфаркт миокарда, инсульт.

В ходе исследования было установлено прогрессирующее увеличение содержания глюкозы в сыворотке крови животных при индуцировании СД2. Так, через три недели после начала введения протамин-сульфата уровень глюкозы в сыворотке крови крыс возрастал в 2,6 раза по сравнению с животными контрольной группы (табл. 4). Введение мелатонин-корректирующих препаратов крысам с СД2 приводило к снижению уровня гликемии по сравнению с патологией. Так, при введении эпифамина в дозе 1,2 мг/кг концентрация глюкозы в крови на 19 сутки после начала эксперимента снижалась в 1,7 раза, при действии эпифамина в дозе 2,5 мг/кг – в 1,8 раза; 5,0 мг/кг – в 1,9 раза. При введении мелаксена в дозе 2,5 мг/кг концентрация глюкозы в крови на 19 сутки после начала эксперимента снижалась в 1,7 раза, при действии мелаксена в дозе 5 мг/кг - в 2,4 раза; 10 мг/кг – в 2,6 раза; 20 мг/кг – в 2,7 раза. В то же время, при введении вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг концентрация глюкозы в крови снижалась в 1,7 раза, при действии вальдоксана в дозе 5,0 мг/кг – в 1,9 раза; 10,0 мг/кг – в 2,0 раза; 20,0 мг/кг – в 1,9 раза (табл. 4).

Таблица 4. Концентрация глюкозы в сыворотке крови крыс экспериментальных групп животных на 15, 17 и 19 день эксперимента

Группы животных	Концентрация глюкозы, мМ		
	15 день	17 день	19 день
1	5,00±0,24	5,26±0,23	5,50±0,26
2	9,02±0,41*	9,72±0,43*	13,74±0,64*
3	8,50±0,36**	8,12±0,33**	7,99±0,38**
4	8,18±0,38**	7,92±0,36**	7,71±0,34**
5	8,05±0,35**	7,87±0,36**	7,30±0,30**
6	8,51±0,39**	8,33±0,35**	8,30±0,33**
7	7,36±0,26**	6,96±0,24**	5,65±0,23**
8	7,71±0,37**	6,20±0,30**	5,33±0,23**
9	7,27±0,34**	5,98±0,27**	5,10±0,24**
10	8,22±0,37**	8,02±0,36**	7,88±0,36**
11	7,68±0,34**	7,41±0,32**	7,33±0,29**
12	7,66±0,35**	7,09±0,30**	6,82±0,28**
13	7,59±0,33**	7,25±0,32**	7,12±0,34**

Примечание: здесь, в таблицах 5-7 и на рисунках 1-27 различия достоверны при $p < 0,05$; (*) - по сравнению с контрольной группой, (**) - по сравнению с группой с СД2.

Можно предполагать, что наблюдаемый эффект объясняется повышением уровня мелатонина в организме. Это согласуется с имеющимися данными о снижении уровня гликемии при введении мелатонина при СД1 и СД2 [193, 206]. Также существуют наблюдения, что у крыс с удаленным эпифизом повышено содержание глюкозы в плазме крови, а также снижены уровень инсулина в плазме и количество рецепторов к инсулину на мембране гепатоцитов. Введение таким крысам мелатонина возвращало эти параметры к норме, причем аффинность рецепторов не менялась [100].

Гипогликемический эффект исследуемых веществ может быть объяснен способностью мелатонина стимулировать использование глюкозы внутри клетки. Так, показано, что при стрептозоциновом СД снижалась активность глюкокиназы в гепатоцитах крыс (в 6 раз), введение мелатонина

ее восстанавливало до уровня контроля, тем самым усиливая утилизацию глюкозы внутри клетки [49]. Мелатонин также активировал киназу гликогенсинтазы-3 β и увеличивал содержание гликогена в клетках HepG2 [165]. У летучих мышей мелатонин усиливал транспорт глюкозы в клетки путем усиления экспрессии GLUT-4 [235].

Среди причин, объясняющих гипогликемический эффект мелатонин-корректирующих препаратов, нельзя исключить также влияние гормона на секрецию инсулина. Механизм действия мелатонина на секрецию инсулина является дискуссионным. Секреция инсулина в естественных условиях, как и в изолированных клетках островков, подчиняется циркадному ритму. На этот ритм влияет мелатонин [211]. Существуют данные, что мелатонин может оказывать эффект на секрецию инсулина *in vivo* и *in vitro* через рецепторы MT(1) и MT(2), активация которых приводит к ингибированию образования цАМФ и уменьшению секреции инсулина. Подобный эффект, вероятно, оказывает и вальдоксан, как селективный агонист мелатониновых рецепторов. Кроме того, мелатонин ингибирует цГМФ-зависимый сигнальный путь, скорее всего через MT(2) рецепторы, также снижая секрецию инсулина. Третий сигнальный путь, по которому сигнал от рецептора передается через G-белок, фосфолипазу C и инозитол-3-фосфат, ведет к повышению секреции инсулина [211]. Таким образом, наиболее вероятным представляется опосредованный механизм влияния мелатонина на содержание глюкозы не связанный с его воздействием на метаболизм инсулина.

3.2. Оценка интенсивности свободнорадикального окисления в печени, почках, сыворотке и сердце крыс с сахарным диабетом 2 типа при введении эпифамина, мелаксена и вальдоксана

3.2.1. Влияние мелатонин-корректирующих препаратов на интенсивность биохемилюминесценции и уровень первичных продуктов пероксидного окисления липидов в тканях крыс с сахарным диабетом 2 типа

Известно, что окислительный стресс является одним из важнейших факторов в патогенезе осложнений СД [59]. В этой связи для определения интенсивности СРП и общей антиоксидантной активности при СД2 и введении эпифамина, мелаксена и вальдоксана был применен метод БХЛ.

При СД2 значение светосуммы БХЛ (S) увеличивалось в печени крыс в 2,6 раза, в почках – в 1,9 раза, в сыворотке крови – в 2,4 раза, в сердце – в 2,3 раза относительно показателя у контрольных животных (табл. 5). У животных с СД2 также наблюдалось увеличение значения интенсивности максимальной вспышки БХЛ (I_{max}) в печени в 2,1 раза, в почках – в 2,3, в сыворотке крови – в 2,0 раза, в сердце – в 2,6 раза по сравнению с контролем (табл. 6), что свидетельствует о возрастании интенсивности СО. В качестве одной из причин развития данного состояния при СД2 может рассматриваться активация полиолового пути, в котором глюкоза превращается в сорбитол с участием альдозоредуктазы. При этом используется большое количество НАДФН, концентрация которого лимитирует функционирование глутатионпероксидазной/глутатионредуктазной АОС.

В результате проведенных исследований у животных с СД2 было выявлено увеличение значения $tg\alpha 2$ БХЛ. В печени $tg\alpha 2$ был повышен в 2,1 раза, в почках - в 1,8, в сыворотке крови - в 2,2 раза, в сердце - в 1,9 раза по сравнению с контролем (табл. 7). Можно предположить, что в условиях СД2 происходит активация резервных путей, направленных на снижение интенсивности СРП в исследуемых тканях.

Таблица 5. Светосумма вспышки биохемилюминесценции (S) в исследуемых тканях животных, mV * с

Группы животных	Исследуемые ткани			
	Печень	Почки	Сыворотка крови	Сердце
1	92,31±3,24	138,19±4,29	307,71±7,32	161,70±1,24
2	236,08±4,25*	259,21±6,24*	739,76±4,33*	373,08±5,30*
3	138,80±2,36**	185,00±6,26**	461,90±2,90**	286,90±4,94**
4	124,20±1,57**	161,90±4,20**	351,90±6,44**	219,40±6,53**
5	128,30±3,62**	158,90±1,36**	335,90±3,45**	226,10±2,34**
6	204,50±5,21**	169,38±5,23**	448,10±4,85**	329,98±5,79**
7	143,45±4,28**	205,56±1,36**	527,86±6,21**	212,12±3,66**
8	112,01±1,65**	173,68±2,34**	407,77±4,58**	172,79±4,56**
9	136,93±3,98**	184,46±2,88**	530,91±5,22**	255,73±7,70**
10	196,61±4,33**	224,93±5,31**	610,56±2,49**	315,46±5,33**
11	163,29±4,54**	189,71±4,89**	459,57±3,77**	260,05±5,51**
12	117,53±3,55**	138,42±3,77**	322,48±5,63**	190,20±4,52**
13	168,88±5,23**	188,54±1,20**	541,60±4,50**	335,91±6,37**

Таблица 6. Интенсивность максимальной вспышки биохемилюминесценции (I_{max}) в исследуемых тканях животных, mV

Группы животных	Исследуемые ткани			
	Печень	Почки	Сыворотка крови	Сердце
1	42,01±1,32	36,22±1,30	25,20±0,88	37,34±1,23
2	86,67±3,50*	81,91±2,20*	51,15±1,11*	96,67±2,60*
3	57,70±1,56**	48,20±2,18**	34,10±1,42**	53,72±1,03**
4	50,90±0,95**	42,00±1,22**	30,09±0,51**	46,00±1,64**
5	52,48±1,66**	40,95±1,74**	29,57±0,60**	48,35±1,55**
6	62,98±2,15**	66,08±2,55**	42,19±1,33**	80,47±2,70**
7	69,64±3,01**	49,09±1,02**	40,69±1,58**	51,33±1,88**
8	58,33±2,61**	41,22±1,60**	29,12±1,31**	45,11±2,00**
9	73,21±1,54**	66,18±2,33**	44,81±1,99**	62,05±2,61**
10	74,30±1,19**	60,96±1,06**	38,54±1,40**	58,26±2,07**
11	67,16±1,22**	51,42±0,68**	33,84±1,19**	52,12±1,01**
12	58,84±2,03**	42,50±1,09**	27,51±1,25**	43,61±1,62**
13	78,21±2,66**	58,64±1,54**	46,29±1,33**	79,21±2,21**

Таблица 7. Тангенс угла наклона кинетической кривой ($\text{tg}\alpha_2$) в исследуемых тканях животных

Группы животных	Исследуемые ткани			
	Печень	Почки	Сыворотка крови	Сердце
1	8,12±0,21	8,29±0,31	13,33±0,50	8,83±0,11
2	16,65±0,28*	14,80±0,64*	29,48±1,02*	16,46±0,55*
3	11,90±0,06**	11,38±0,26**	18,43±0,47**	11,75±0,22**
4	11,10±0,12**	10,60±0,33**	15,50±0,49**	10,30±0,40**
5	11,17±0,24**	10,20±0,01**	15,56±0,60**	9,90±0,17**
6	13,24±0,30**	10,52±0,07**	26,34±1,18**	16,53±0,59**
7	13,39±0,02**	10,71±0,37**	20,02±0,68**	15,97±0,66**
8	10,25±0,44**	8,93±0,35**	14,61±0,15**	14,41±0,31**
9	13,03±0,50**	12,32±0,27**	26,41±1,00**	14,46±0,41**
10	13,45±0,31**	12,63±0,04**	22,40±0,60**	13,45±0,25**
11	12,74±0,20**	11,87±0,40**	20,32±0,32**	14,17±0,47**
12	8,84±0,08**	9,35±0,33**	16,28±0,15**	11,78±0,33**
13	14,80±0,51**	11,97±0,27**	23,95±0,74**	11,49±0,20**

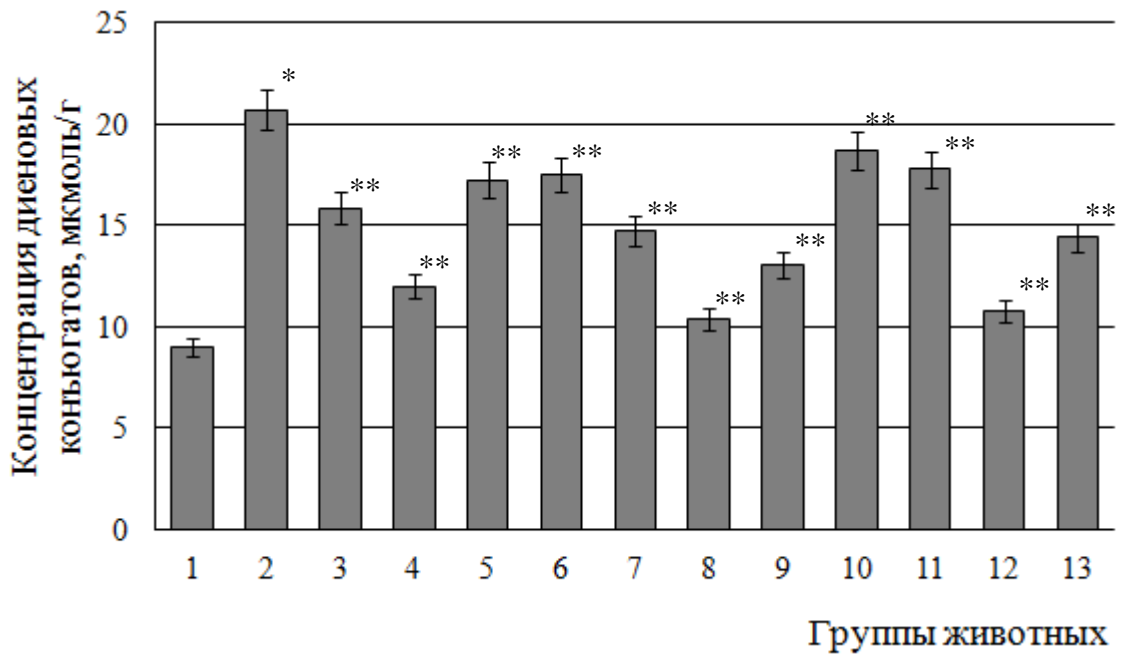
При введении эпифамина крысам с патологией наблюдалось снижение S в исследуемых тканях по сравнению с показателем при СД2 (табл. 5). Так, величина S при действии эпифамина в дозе 1,2 мг/кг снижалась в печени, почках, сыворотке крови и сердце крыс соответственно в 1,7, 1,4, 1,6 и 1,3 раза, при действии эпифамина в дозе 2,5 мг/кг – в 1,9, 1,6, 2,1 и 1,7 раза, в дозе 5,0 мг/кг – в 1,8, 1,6, 2,2 и 1,7 раза. При действии мелаксена в дозах 2,5 и 10 мг/кг наблюдалось снижение S в печени соответственно в 1,2 и 2,1 раза, дозах 5,0 и 20 мг/кг – в 1,7 раза. Введение мелаксена в дозах 2,5 и 10 мг/кг способствовало уменьшению S в почках на 53% и 49%, в дозах 5,0 и 20 мг/кг – на 26% и 41% соответственно. В сыворотке крови показатель S снижался на 65% и 81% при использовании мелаксена в дозах 2,5 и 10 мг/кг и в 1,4 раза – в дозах 5,0 и 10 мг/кг. При введении мелаксена в дозах 2,5, 5,0, 10 и 20 мг/кг в сердце величина S была ниже значений при патологии в 1,1, 1,8, 2,2 и 1,5 раза (табл. 5). Введение вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг животным с патологией приводило к снижению S в печени и сыворотке более чем на 20%, в почках – на 15%, в сердце на 18%. При действии вальдоксана в дозах 5,0 и 20 мг/кг

значение S снижалось в печени и почках в 1,4 раза, в сыворотке в 1,6 и 1,4 раза, в сердце в 1,4 и 1,1 раза по сравнению с показателями животных с СД2. При введении вальдоксана в дозе 10 мг/кг происходило уменьшение S в печени и сердце в 2,0 раза, в почках в 1,9 раза, в сыворотке в 2,3 раза (табл. 5).

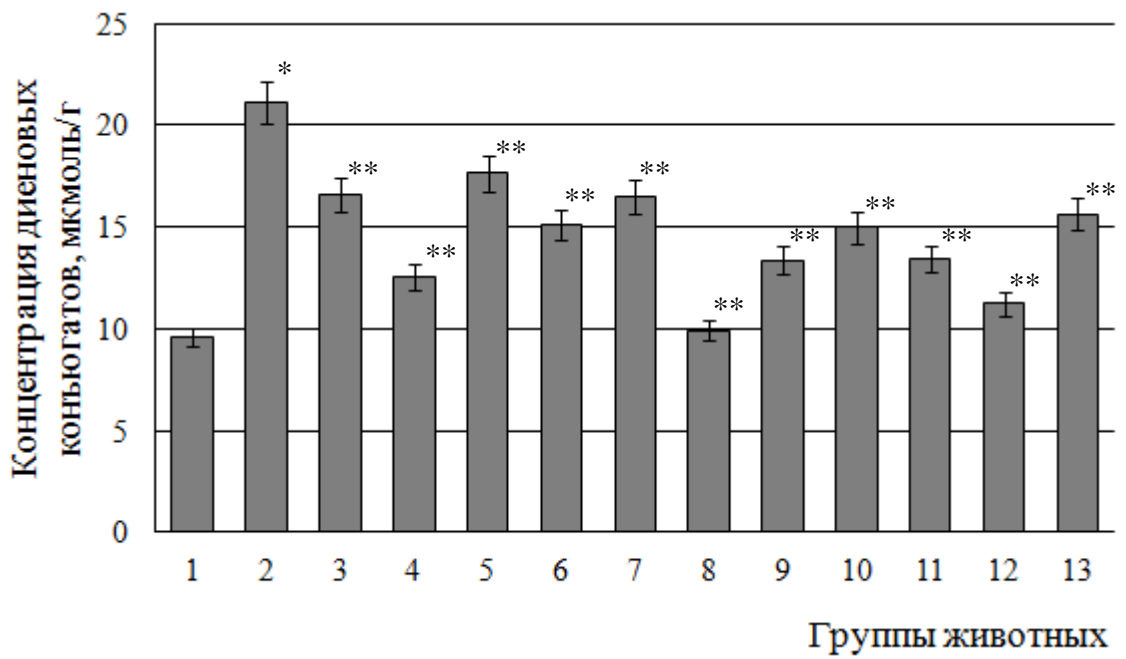
Введение эпифамина в дозе 1,2 мг/кг при СД2 также приводило к снижению I_{\max} в печени и сыворотке в 1,5 раза, в почках – в 1,7 раза, в сердце – в 1,8 раза по сравнению с патологией (табл. 6). Применение эпифамина в дозах 2,5 и 5,0 мг/кг уменьшало значение I_{\max} в печени и сыворотке в 1,7 раза, а в почках в 2,0 раза. При этом в сердце данный показатель снижался в 2,1 раза (2,5 мг/кг) и 2,0 раза (5,0 мг/кг) по сравнению с показателями при СД2. При действии мелаксена в дозе 2,5 мг/кг наблюдалось снижение I_{\max} в печени на 38%, в почках, сыворотке и сердце более чем на 20%, в дозе 5,0 мг/кг – в 1,2, 1,7, 1,3 и 1,9 раза в печени, почках, сыворотке и сердце, в дозе 10 мг/кг – в 1,5, 2,0, 1,8 и 2,1 раза соответственно. Кроме того, при введении мелаксена в дозе 20 мг/кг показатель I_{\max} был ниже в печени и почках в 1,2 раза, в сыворотке в 1,1 раза, в сердце в 1,6 раза по сравнению с уровнем при патологии (табл. 6). Сходные изменения были характерны и для групп животных, которым вводили вальдоксан. Так, при действии указанного вещества в дозах 2,5 и 5,0 мг/кг наблюдалось снижение I_{\max} в печени на 17% и 29%, в почках на 34% и 59%, в сыворотке на 33% и 51% и в сердце на 66% и 86% по сравнению с уровнем при развитии заболевания. При введении вальдоксана в дозе 10 мг/кг I_{\max} снижался в печени в 1,5 раза, почках и сыворотке в 1,9 раза, в сердце 2,2 раза, в дозе 20 мг/кг – в 1,1 раза в печени и сыворотке, в 1,4 раза в почках и в 1,2 раза в сердце (табл. 6). Регистрируемое снижение уровня СО может быть результатом проявления антиоксидантных свойств мелатонина, уровень которого способны корректировать исследуемые препараты. Известно, что мелатонин способен нейтрализовать целый спектр АФК в организме [46], в том числе и гидроксильный радикал – самый реакционноспособный кислородный радикал [211].

В ходе эксперимента было зарегистрировано снижение $tg\alpha_2$ под воздействием эпифамина в дозах 1,2, 2,5 и 5,0 мг/кг: в почках – в 1,3, 1,4 и 1,5 раза, в сыворотке – в 1,6, 1,9 и 1,5 раза, в сердце – в 1,4, 1,6 и 1,7 раза по сравнению с группой животных с СД2. Кроме того, установлено, что в печени крыс с патологией, которым вводили эпифамин в дозе 1,2 мг/кг, величина $tg\alpha_2$ снижалась в 1,4 раза, в дозе 2,5 и 5,0 мг/кг – в 1,5 раза (табл. 7). Кроме того, происходило снижение $tg\alpha_2$ при введении мелаксена в дозе 2,5 мг/кг в печени, почках и сыворотке в 1,3, 1,4 и 1,1 раза, в дозе 5,0 мг/кг в 1,2, 1,4 и 1,5 раза, в дозе 10 мг/кг в 1,6, 1,7 и 2,0 раза, в дозе 20 мг/кг в 1,3, 1,2 и 1,1 раза соответственно (табл. 7). Снижение данного параметра в тканях сердца на 14% было отмечено только при введении мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг. При введении вальдоксана в дозах 2,5, 5,0, 10 и 20 мг/кг наблюдалось снижение $tg\alpha_2$ в печени в 1,2, 1,3, 1,9 и 1,1 раза, в сыворотке в 1,3, 1,5, 1,8 и 1,2 раза. Применение вальдоксана в дозах 2,5 и 20 мг/кг способствовало уменьшению $tg\alpha_2$ в почках в 1,2 раза, в дозе 5,0 мг/кг – в 1,3 раза, в дозе 10 мг/кг – в 1,6 раза. При этом в сердце величина $tg\alpha_2$ была ниже значений при патологии в 1,2 раза при использовании вальдоксана в дозах 2,5 и 5,0 мг/кг и в 1,4 раза – в дозах 10 и 20 мг/кг (табл. 7). Это, очевидно, связано с уменьшением степени мобилизации АОС в условиях торможения свободнорадикальных процессов.

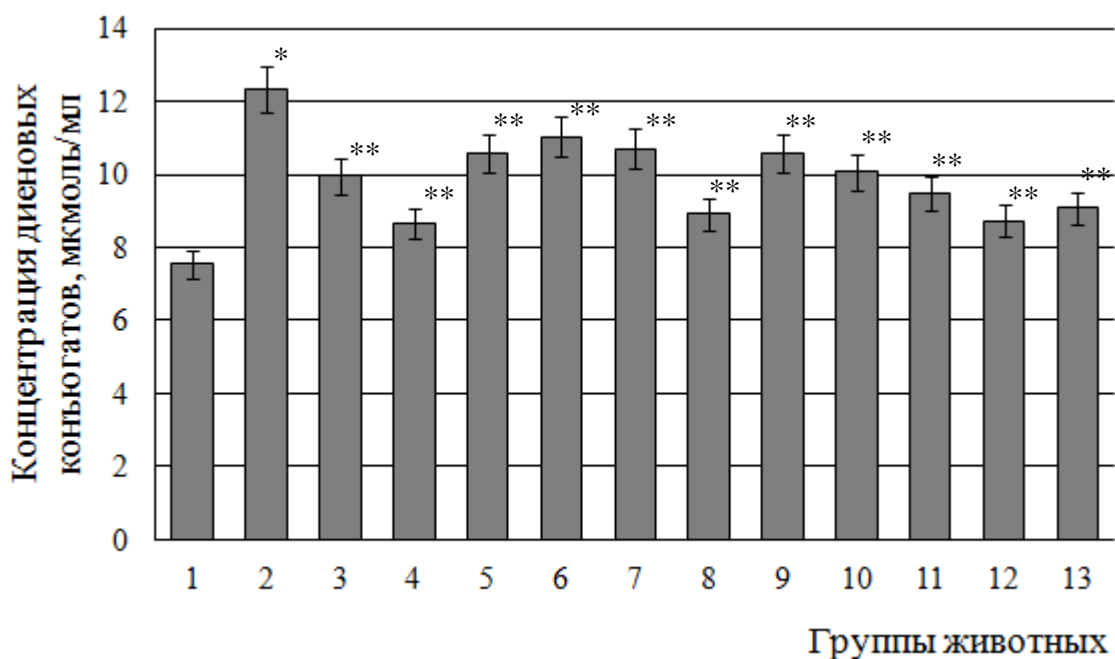
Известно, что при СД2 происходит интенсификация процессов ПОЛ, приводящая к возрастанию количества продуктов свободнорадикального окисления и пероксидов биомолекул, оказывающих токсическое влияние на клеточные структуры. В этой связи, нами была проведена оценка уровня первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов. Так при развитии СД2 их содержание увеличивалось в печени в 2,3 раза, в почках в 2,2 раза, в сыворотке крови в 1,6 раза и в сердце в 3,2 раза (рис. 1).



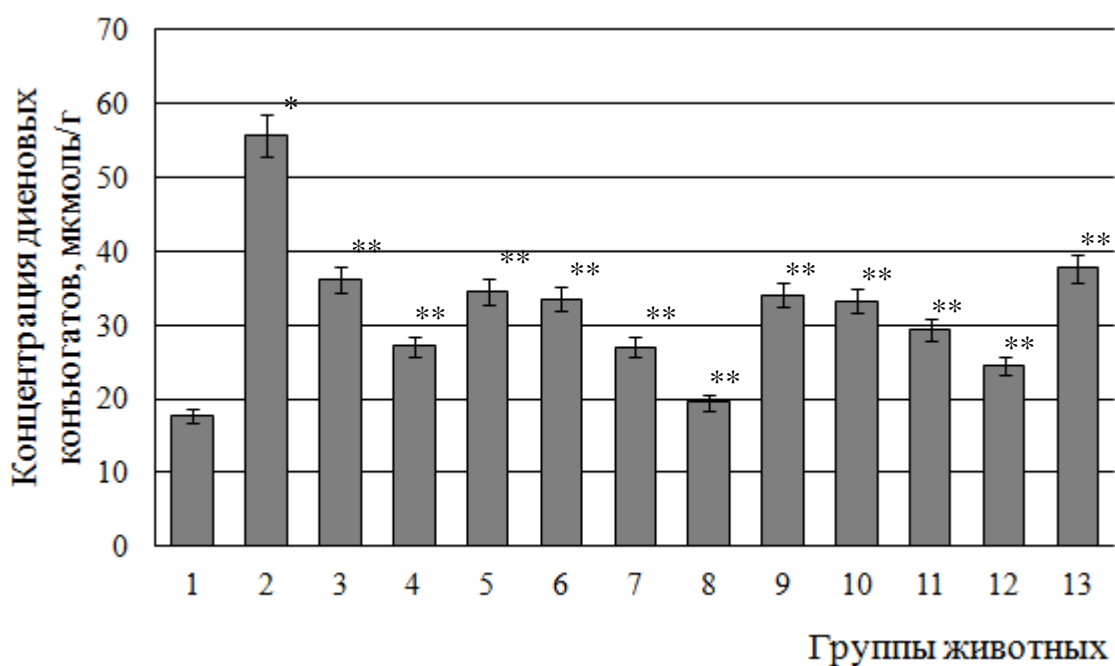
а



б



В



Г

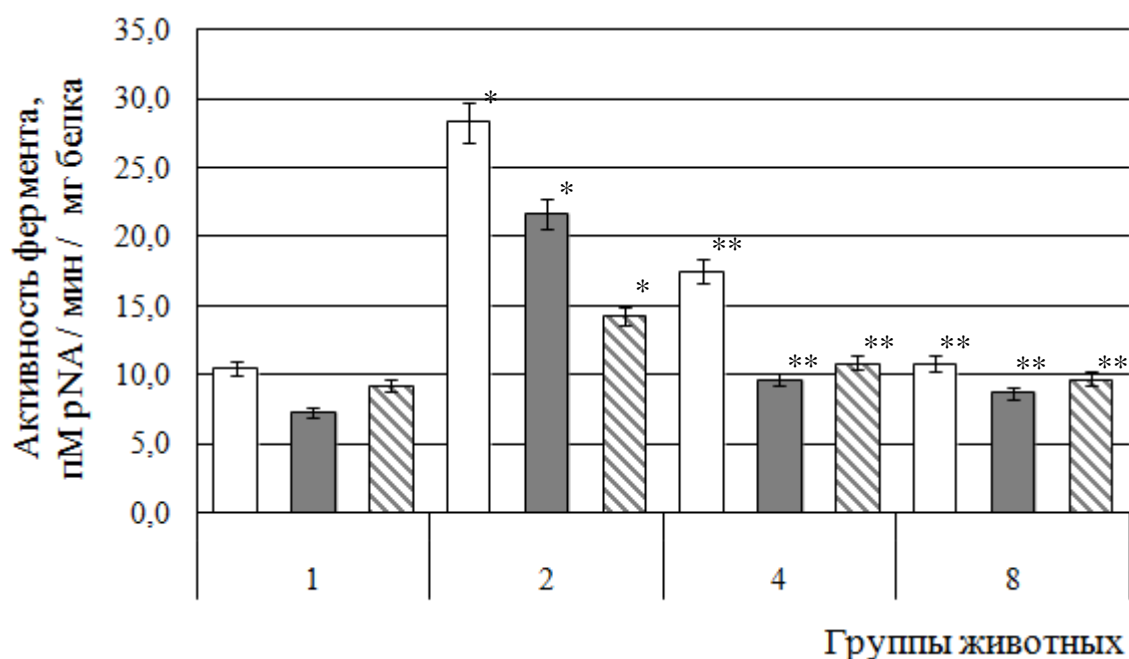
Рис. 1. Содержание диеновых конъюгатов в печени (а), почках (б), сыворотке крови (в) и сердце (г) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)

Введение эпифамина животным с СД2 приводило к снижению уровня первичных продуктов ПОЛ. Так, применение эпифамина в дозе 1,2 мг/кг понижало содержание ДК в печени и почках в 1,3 раза, в сыворотке – в 1,2 раза, в сердце – в 1,5 раза, в дозе 2,5 мг/кг – соответственно в 1,7, 1,4 и 2,1 раза (рис. 1). Введение эпифамина в дозе 5,0 мг/кг приводило к снижению исследуемого параметра в печени, почках и сыворотке в 1,2 раза, в сердце – в 1,6 раза. Также, применение мелаксена в дозах 2,5 и 5,0 мг/кг приводило к снижению концентрации ДК в печени, почках, сыворотке и сердце соответственно в 1,2, 1,4, 1,1 и 1,7 раза по сравнению с уровнем при экспериментальном СД2 (рис. 1). Сходные результаты были получены и при введении мелаксена в дозах 5,0, 10 и 20 мг/кг, при этом наибольшим положительным эффектом обладала доза 10 мг/кг (рис. 1). Наряду с этим, при введении вальдоксана в дозах 2,5 и 5,0 мг/кг наблюдалось снижение уровня первичных продуктов ПОЛ в печени в 1,1 и 1,2 раза, в почках в 1,4 и 1,6 раза, в сыворотке в 1,2 и 1,3 раза, в сердце в 1,7 и 1,9 раза соответственно. Установлено, что при действии вальдоксана в дозе 10 мг/кг концентрация ДК уменьшалась в печени и почках в 1,9 раза, в сыворотке в 1,4 раза, в сердце в 2,3 раза. Введение вальдоксана в дозе 20 мг/кг животным с СД2 снижало уровень ДК в печени, почках и сыворотке в 1,4 раза, в сердце 1,5 раза (рис. 1). Вероятно, введение исследуемых веществ способствовало росту содержания мелатонина в организме животных, который обладает способностью нейтрализовать карбонильные радикалы [203], оксид азота [57], пероксинитрит анион [6], а также некоторые ароматические радикалы биологического происхождения [199], образование которых имеет место при СД2. Кроме того, мелатонин способен нейтрализовать OH^{\bullet} -радикал, тем самым снижая интенсивность процессов ПОЛ, способствуя прерыванию реакций инициации.

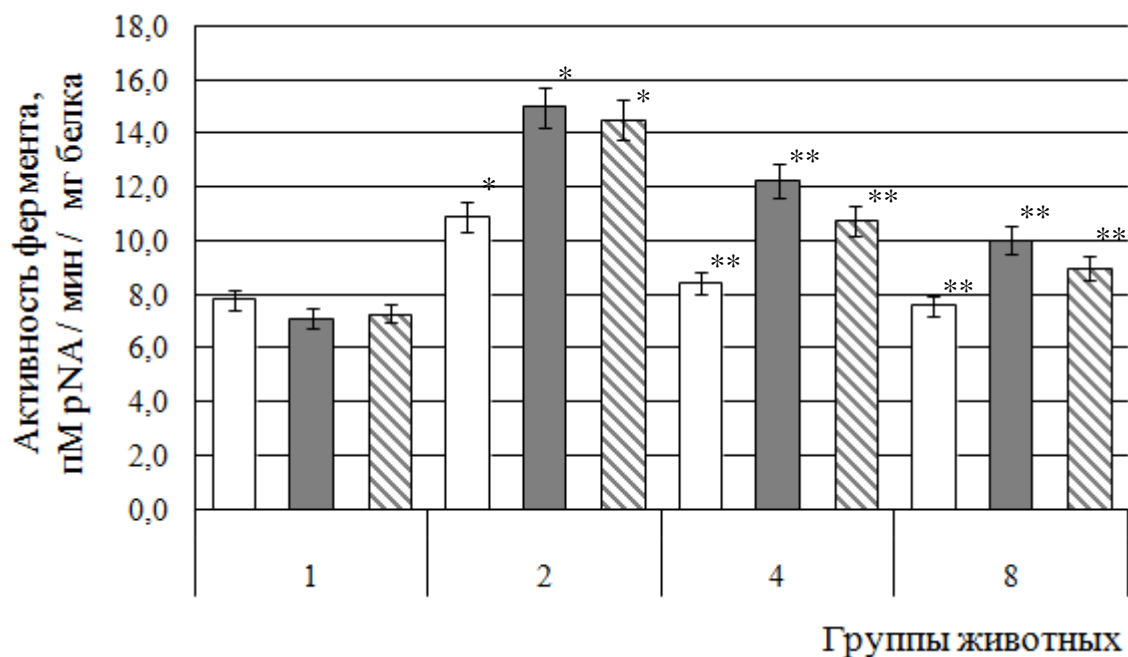
3.2.2. Активность каспаз в тканях крыс при сахарном диабете 2 типа и введении мелатонин-корректирующих препаратов

Известно, что нарушение окислительного метаболизма зачастую приводит к активации сигнальных молекул и интенсификации процесса апоптоза. В этой связи, для оценки интенсивности апоптотических процессов в тканях крыс с СД2 и действия веществ-протекторов был осуществлен анализ активности каспазы-3 и -8.

В ходе эксперимента было установлено, что активность каспазы-3 и каспазы-8 во 2-ой экспериментальной группе животных возрастала соответственно в печени в 2,7 и 1,4 раза, в почках в 3,0 и 2,9 раза, в сердце в 1,5 и 2,0 раза. Это свидетельствует об интенсификации апоптоза при развитии СД2. Вероятно, наблюдаемый эффект был связан с интенсификацией процессов СО и ростом уровня АФК, что приводило к ускорению деградации естественного ингибитора каспазы-8 – белка с-FLIP [253].



а



б

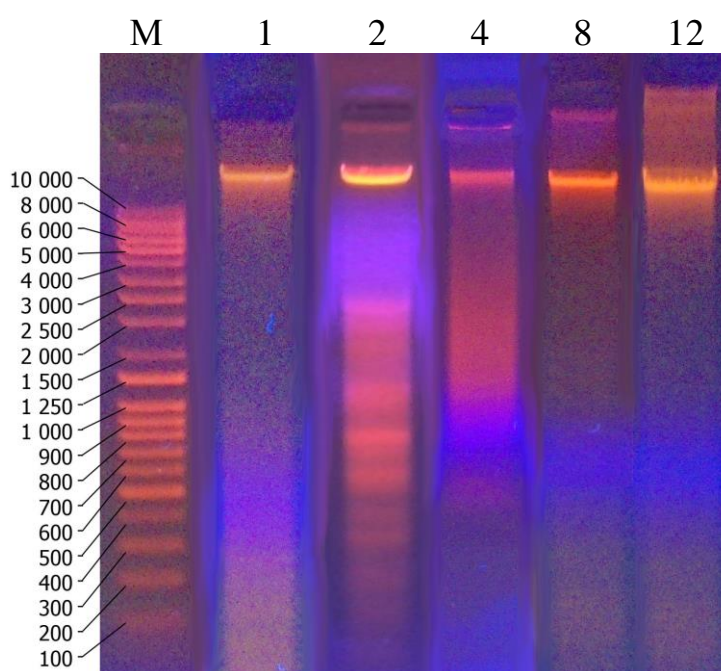
Рис. 2. Активность каспазы-3 (а) и каспазы-8 (б) в печени (□), почках (■) и сердце (▨) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина (4) и мелаксена (8)

Установлено, что введение эпифамина в дозе 2,5 мг/кг и мелаксена в дозе 10 мг/кг крысам с СД2 приводило к снижению активности каспазы-3 в печени в 1,6 и 2,6 раза, в почках в 2,2 и 2,5 раза, в сердце в 1,3 и 1,5 раза (рис. 2а). Введение исследуемых препаратов в указанных дозах способствовало изменению активности каспазы-8 в сторону контрольных значений у экспериментальных животных – в печени в 1,3 и 1,4 раза, в почках в 1,2 и 1,5 раза, в сердце в 1,4 и 1,6 раза соответственно (рис. 2б). Антиапоптотический эффект эпифамина и мелаксена, вероятно, обусловлен снижением интенсивности СРП в исследуемых тканях животных, благодаря коррекции содержания мелатонина. Очевидно, повышение содержания данного гормона снижало соотношение про- и антиапоптотических белков, изменяя уровень их экспрессии в направлении контрольных значений. Так известно, что при болезни Альцгеймера, мелатонин значительно снижает активность Вах и

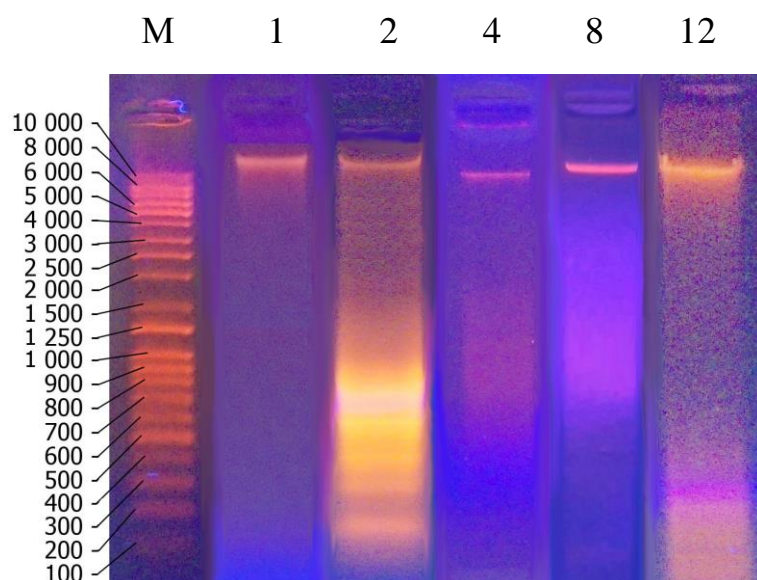
каспазы 3, таким образом, снижая интенсивность апоптотических процессов в нейронах мозга [99].

3.2.3. Оценка степени фрагментации ДНК в тканях крыс с сахарным диабетом 2 типа при введении препаратов, корректирующих уровень мелатонина

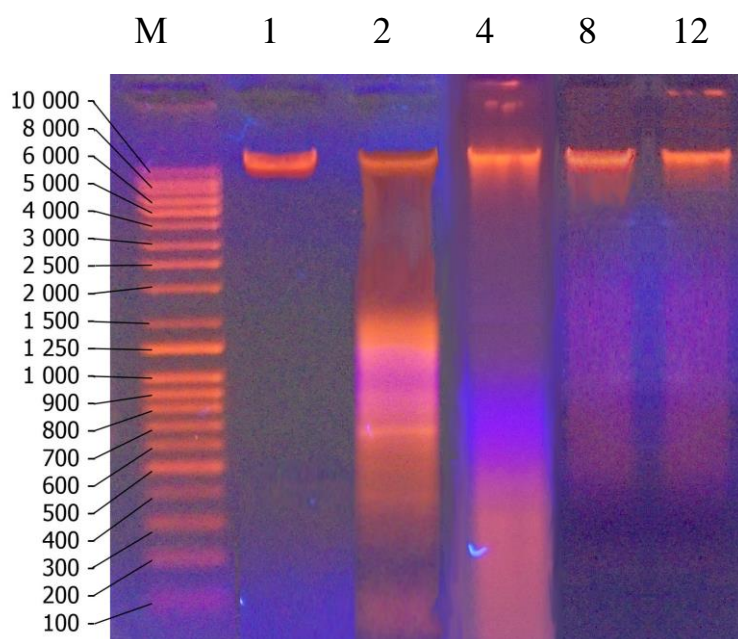
Активация каспаз обуславливает такой важный признак апоптоза, как конденсацию хроматина с последующей фрагментацией ДНК. В этой связи из клеток печени, почек и сердца животных с экспериментальным СД2 и животных, которым на фоне патологического состояния вводили мелатонин-корректирующие препараты, была выделена ДНК и проведен электрофорез полученных образцов в агарозном геле. Анализ электрофореграммы свидетельствует о наличии фрагментации ДНК в тканях крыс с СД2, что проявляется в виде характерной апоптотической лестницы (рис. 3). При этом в тканях контрольных животных выявлялась одна полоса, характерная для высокомолекулярной ДНК нормальных клеток.



а



б



в

Рис. 3. Электрофореграмма образцов ДНК из клеток печени (а), почек (б) и сердца (в) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина (4), мелаксена (8) и вальдоксана (12)

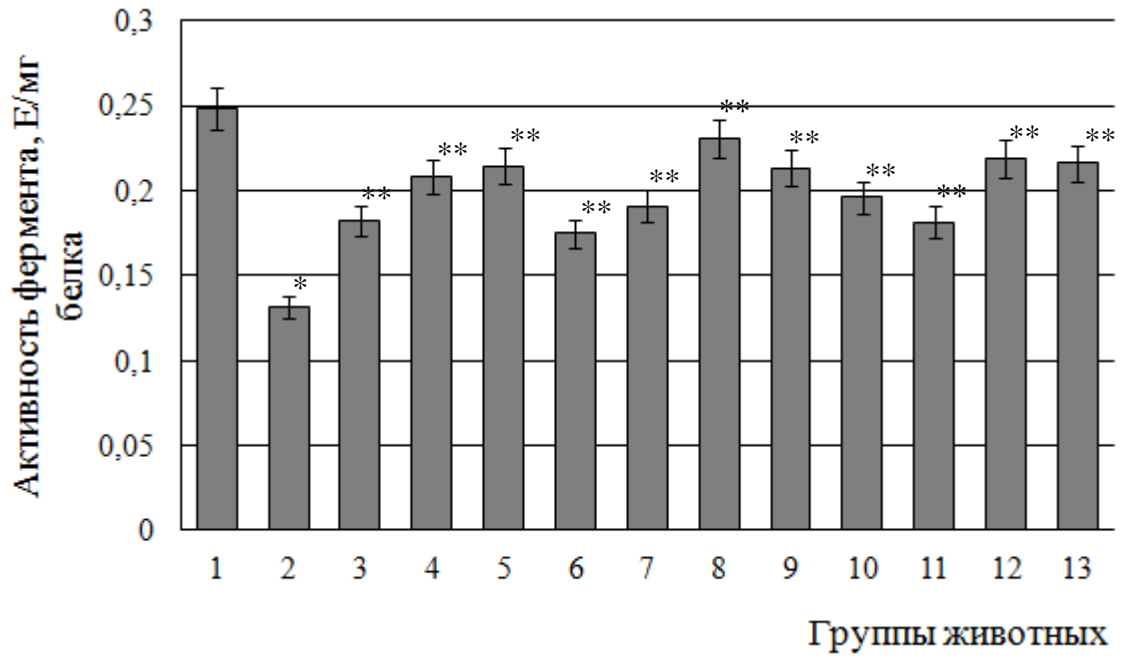
Введение животным с патологией эпифамина в дозе 2,5 мг/кг, а также мелаксена и вальдоксана в дозе 10 мг/кг приводило к снижению степени

фрагментации ДНК, что подтверждает способность исследуемых веществ оказывать антиапоптотическое действие (рис. 3).

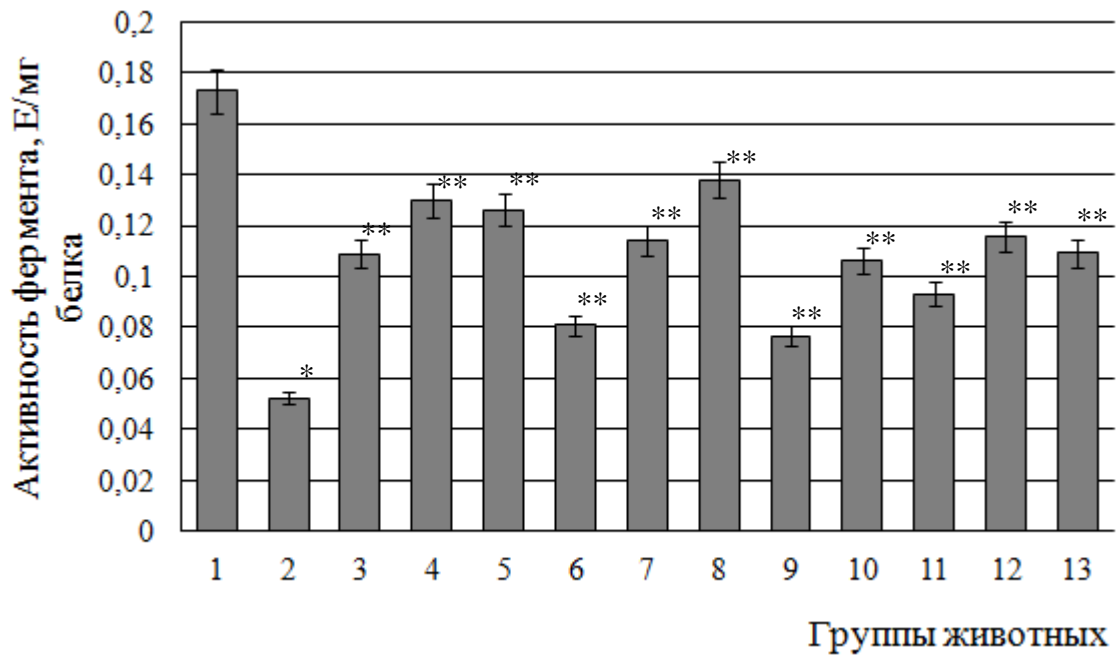
3.2.4. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на активность аконитатгидратазы и уровень цитрата в тканях крыс при развитии сахарного диабета 2 типа

Результаты проведенных исследований показали, что при СД2 у крыс происходит снижение удельной активности аконитазы в печени в 1,9 раза, в почках – в 3,3 раза, в сыворотке крови - в 2,7 раза, в сердце - в 3,7 раза относительно контроля (рис. 4). При этом активность фермента в печени, почках и сердце, выраженная в виде Е/г сырой массы, и в сыворотке крови, выраженная в виде Е/мл, изменялась сходным образом (рис. 5). Известно, что активность АГ может служить маркером окислительного стресса, так как под действием АФК фермент теряет активность вследствие окислительной модификации активного центра и высвобождения атома железа из железосерного кластера [114].

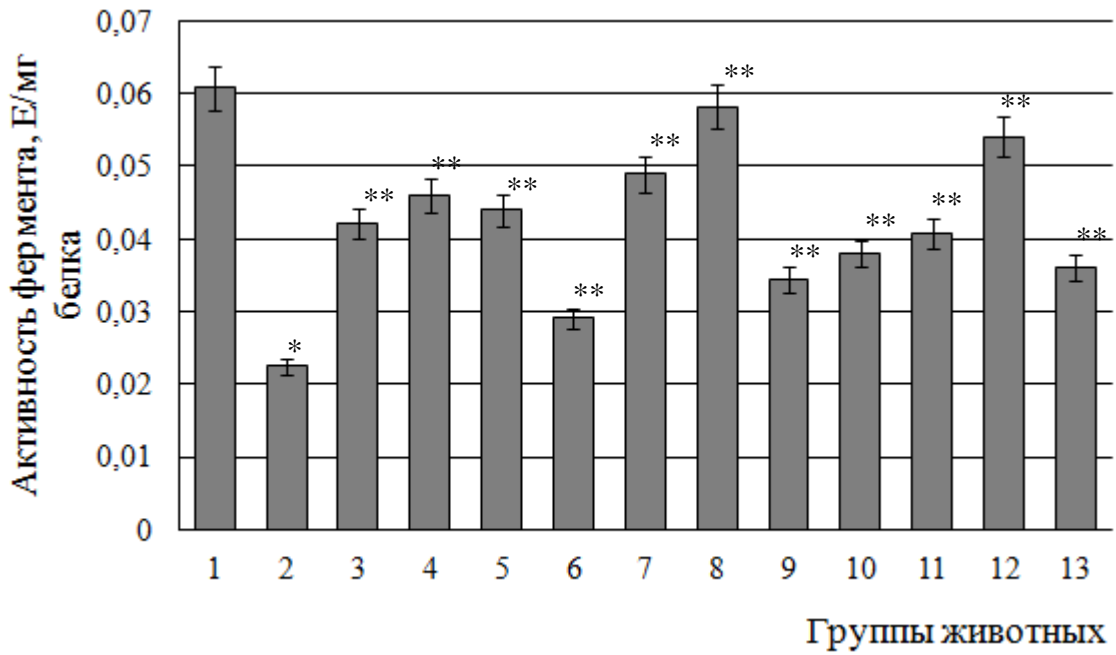
При введении мелатонин-корректирующих препаратов было выявлено увеличение удельной активности АГ в тканях крыс по сравнению со значениями при патологии. Так, удельная активность АГ при действии эпифамина в дозе 1,2 мг/кг возрастала в печени, почках, сыворотке крови и сердце крыс соответственно в 1,4, 2,1, 1,9 и 2,2 раза, при действии эпифамина в дозе 2,5 мг/кг – в 1,6, 2,5, 2,1 и 2,7 раза, в дозе 5,0 мг/кг – в 1,6, 2,4, 2,0 и 2,6 раза (рис. 4). При этом активность, выраженная в виде Е/г сырой массы, возрастала в печени, почках и сердце при введении эпифамина в дозе 1,2 мг/кг в 1,3, 1,7 и 2,5 раза, в дозе 2,5 мг/кг в 1,4, 1,9 и 2,8 раза, в дозе 5,0 мг/кг в 1,4, 1,8 и 2,8 раза соответственно. В сыворотке крови активность фермента, выраженная в виде Е/мл, возрастала в 1,5, 1,7 и 1,6 раза у крыс 3, 4 и 5 экспериментальных групп соответственно (рис. 5). Введение животным с СД2 мелаксена в дозе 2,5 мг/кг сопровождалось возрастанием как удельной



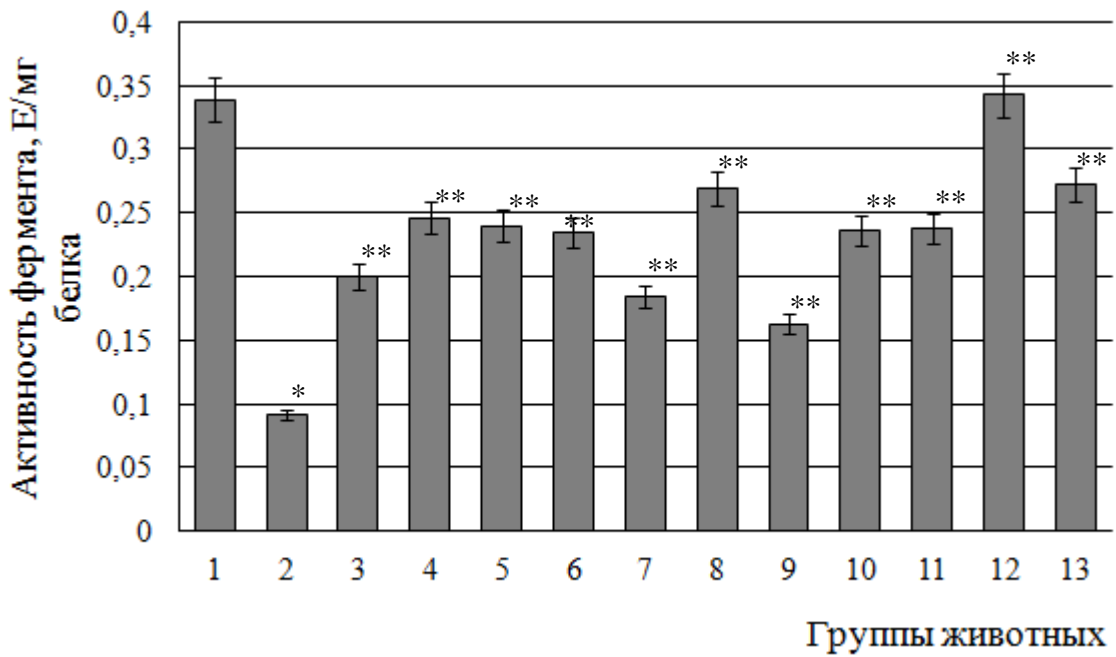
а



б

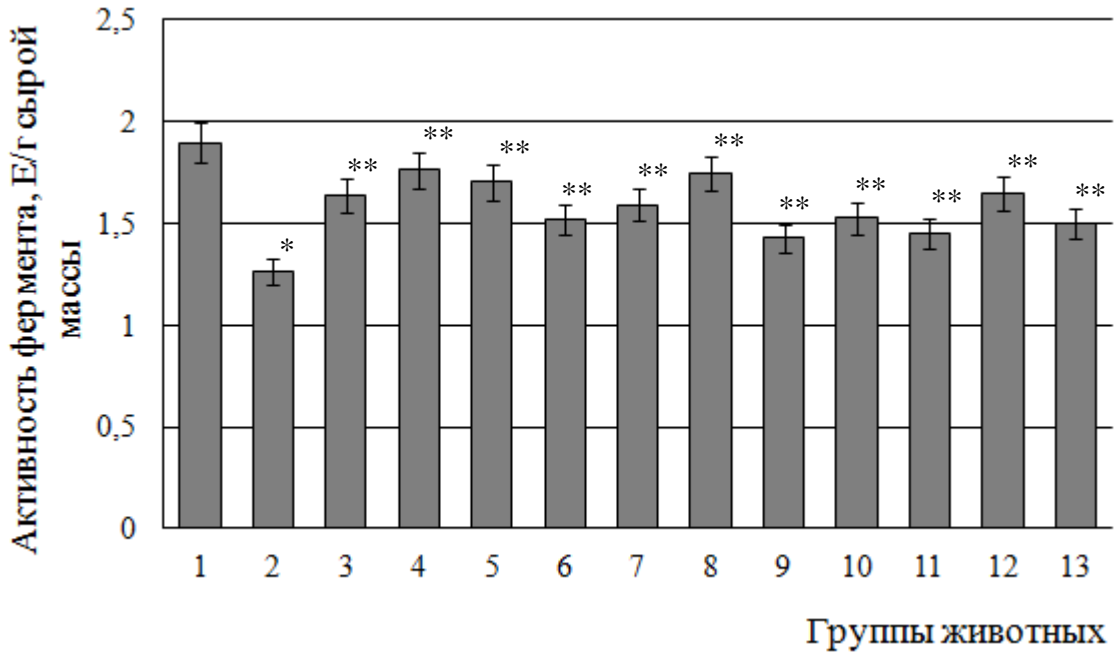


В

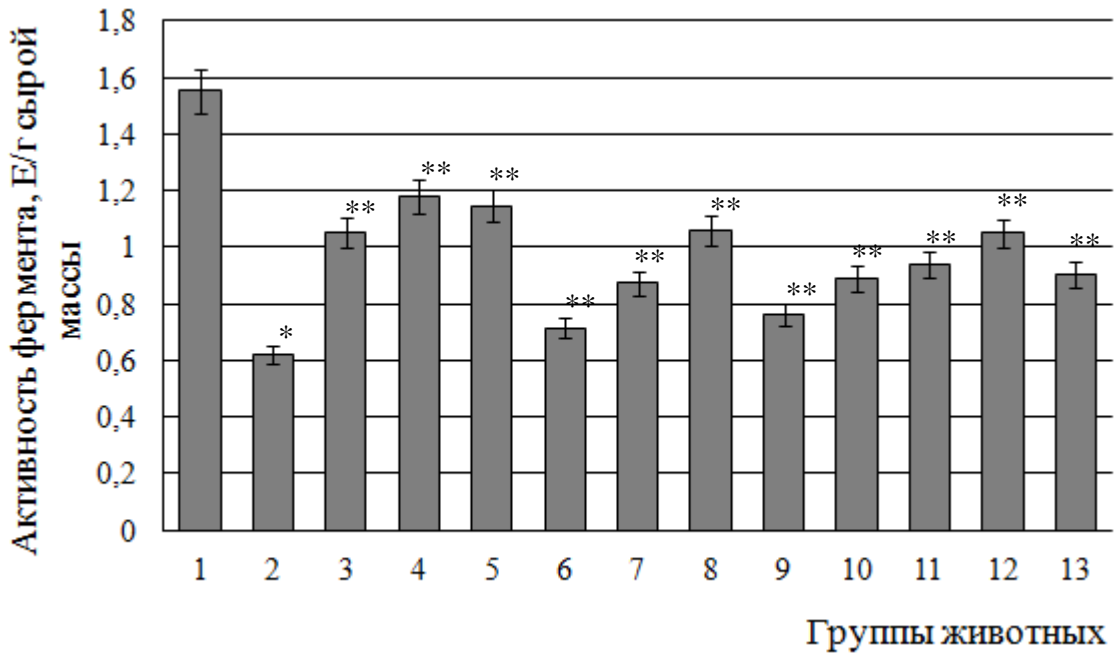


Г

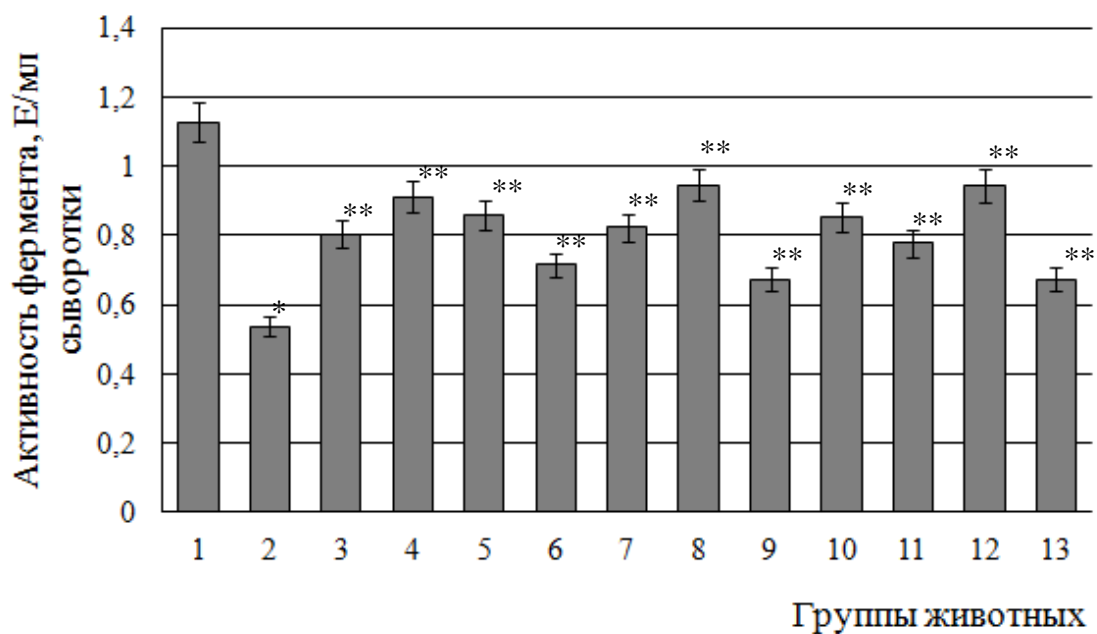
Рис. 4. Активность аконитатгидратазы, выраженная в Е/мг белка, в печени (а), почках (б), сыворотке (в) и сердце (г) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)



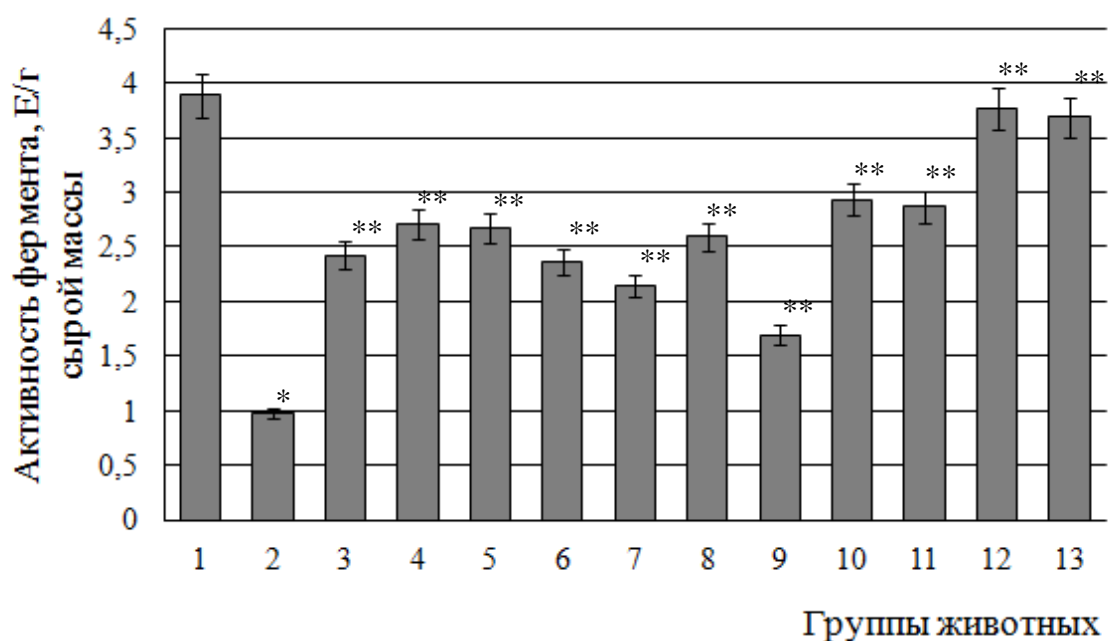
а



б



в



г

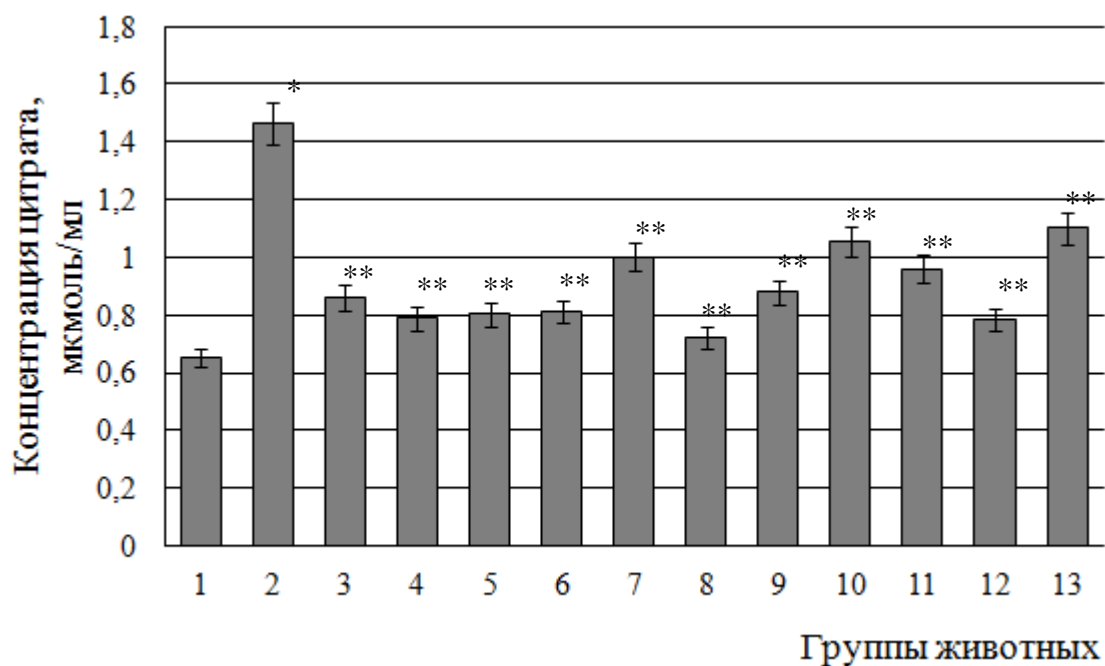
Рис. 5. Активность аконитатгидратазы, выраженная в Е/г сырой массы, в печени (а), почках (б), и сердце (г) и в Е/мл в сыворотке (в) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)

активности АГ, так и активности, выраженной в виде Е/г сырой массы, в печени в 1,3 и 1,2 раза, в почках – в 1,5 и 1,2 раза, в сердце – в 2,7 и 2,4 раза (рис. 4, 5). В сыворотке активность АГ, выраженная в Е/мг белка и в Е/мл, возрастала в 1,3 раза по сравнению с уровнем при патологии. Сходная тенденция была отмечена и при введении других доз данного препарата, при этом наибольший положительный эффект был отмечен для дозы 10 мг/кг – удельная активность фермента возрастала в печени в 1,8 раза, в сердце в 2,9 раза, в почках и сыворотке в 2,6 раза соответственно. Удельная активность фермента в печени при введении вальдоксана в дозе 10 и 20 мг/кг крысам с СД2, а также в сыворотке крови при введении данного препарата в дозе 2,5 мг/кг возрастала в 1,7 раза. Также, при введении вальдоксана в дозе 5,0 мг/кг наблюдалось снижение активности АГ, выраженной в Е/мг белка, в почках и сыворотке в 1,8 раза по сравнению с уровнем при патологии. Применение вальдоксана в дозе 2,5 и 5,0 мг/кг приводило к снижению удельной активности фермента в печени в 1,5 и 1,4 раза, в сердце – в 2,6 раза, в дозах 10 и 20 мг/кг – в почках в 2,2 и 2,1 раза, в сыворотке в 2,4 и 1,6 раза, в сердце в 3,7 и 3,0 раза, соответственно (рис. 4, 5).

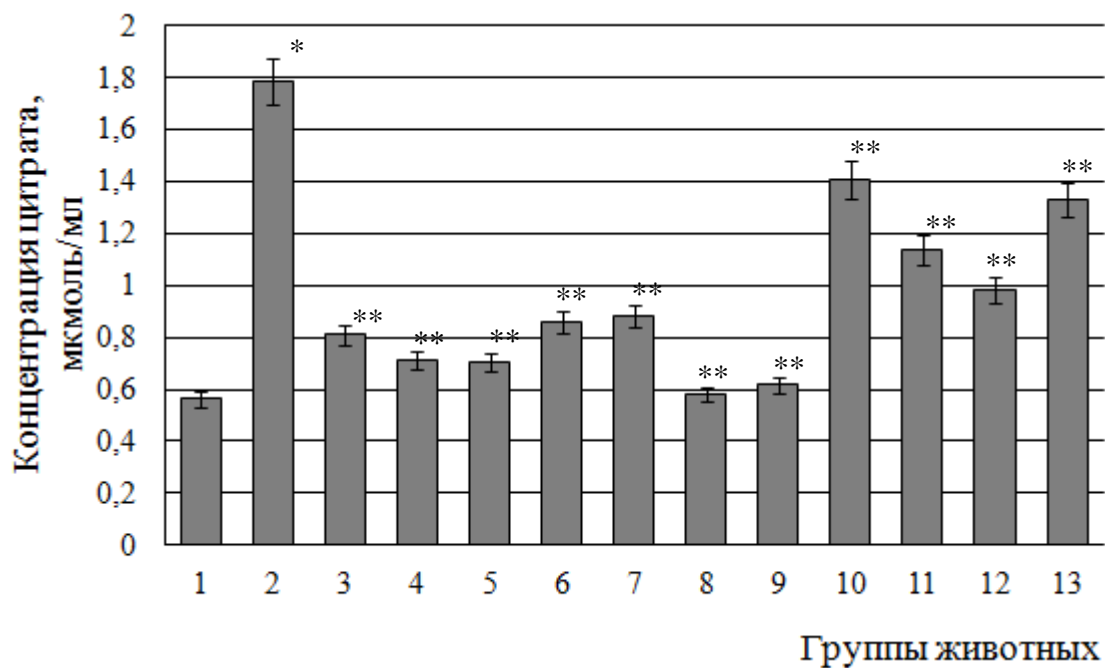
Изменение активности исследуемого фермента в сторону контрольных значений при введении мелатонин-корректирующих препаратов животным с СД2, очевидно, свидетельствует о меньшей степени повреждения активного центра АГ по сравнению с патологией в результате снижения интенсивности СРП под действием мелатонин-корректирующих препаратов.

Известно, что возрастание интенсивности СРП способствует накоплению цитрата в организме [95]. Способность указанного вещества хелатировать ионы металлов с переменной валентностью и тем самым предотвращать образование OH^\bullet в реакциях Фентона и Хабера – Вайса, позволяет относить его к низкомолекулярным антиоксидантам [27]. В этой связи, представляет интерес определение содержания цитрата в тканях крыс с СД2 и при введении мелатонин-корректирующих препаратов.

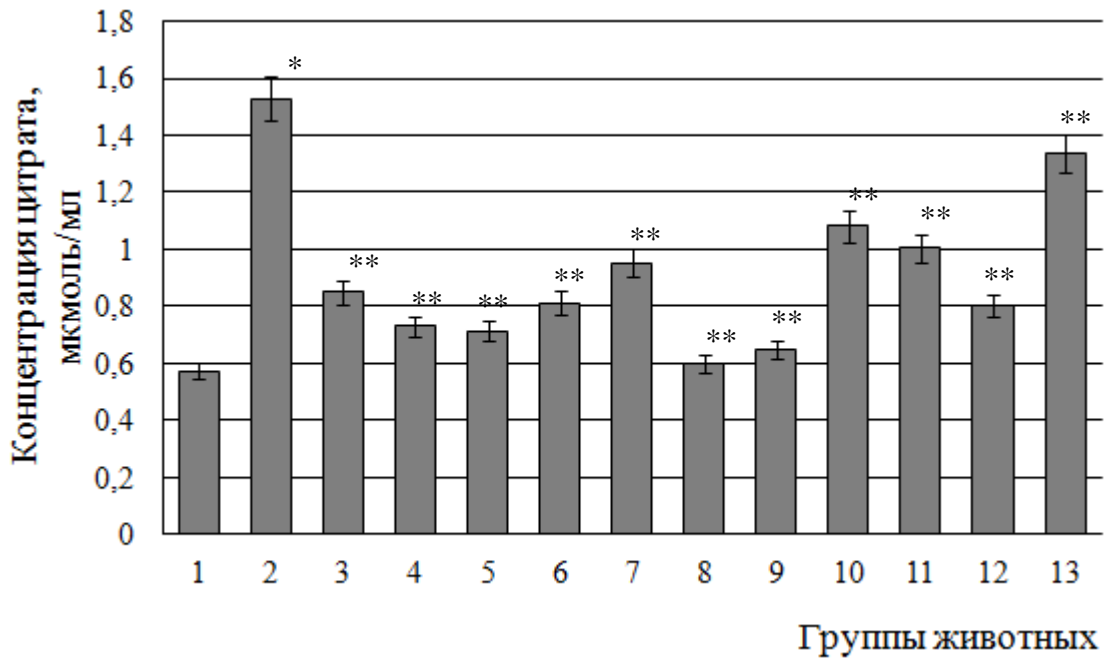
Результаты проведенных исследований показали, что при СД2 у крыс происходит увеличение содержания цитрата в печени в 2,3 раза, в почках – в 3,2 раза, в сыворотке крови – в 2,7 раза и в сердце – в 1,5 раза по сравнению с контрольными значениями (рис. 6). Это может быть связано с уменьшением активности АГ, фермента катализирующего превращения цитрата в изоцитрат.



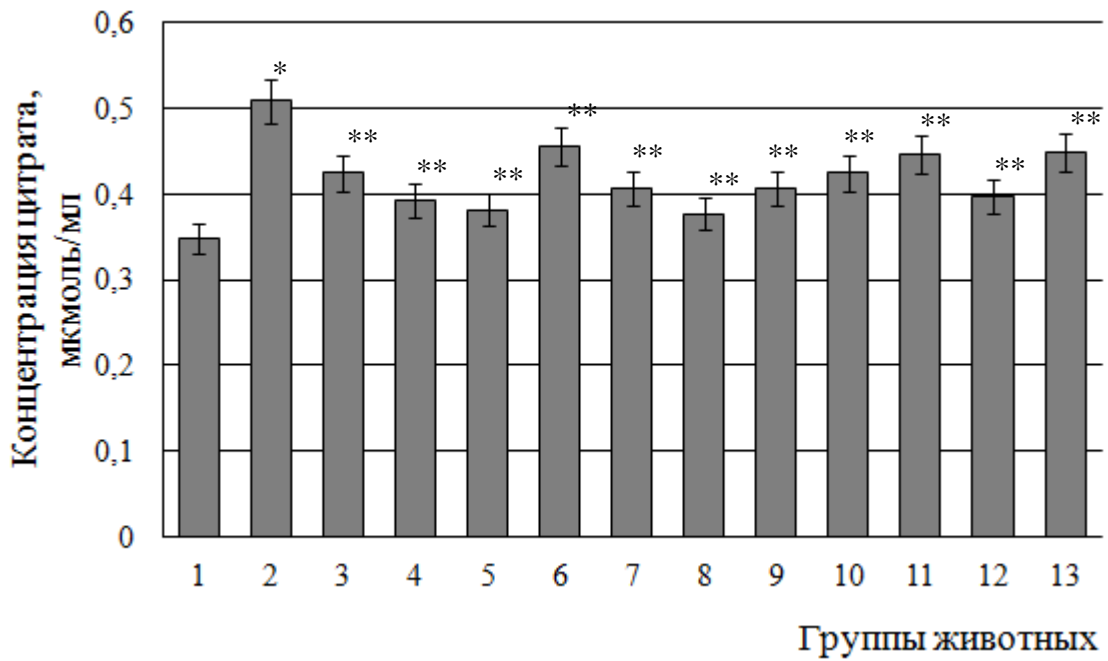
а



б



в



г

Рис. 6. Содержание цитрата в печени (а), почках (б), сыворотке (в) и сердце (г) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)

Введение эпифамина крысам с СД2 в дозе 1,2 мг/кг приводило к снижению уровня цитрата в печени в 1,7 раза, в почках – в 2,2 раза, в сыворотке крови – в 1,8 раза в сердце – в 1,2 раза, по сравнению с группой животных с патологией. При действии эпифамина в дозе 2,5 мг/кг концентрация цитрата снижалась в печени, почках, сыворотке крови и сердце крыс соответственно в 1,9, 2,5, 2,1 и 1,3 раза, в дозе 5,0 мг/кг – в 1,8, 2,5, 2,2 и 1,3 раза по сравнению с патологией (рис. 6). При действии мелаксена в дозах 2,5, 5, 10 и 20 мг/кг наблюдалось снижение концентрации цитрата в печени соответственно в 1,8, 1,5, 2,0 и 1,7 раза, в почках – в 2,1, 2,0, 3,1 и 2,9 раза, в сыворотке - в 1,9, 1,6, 2,6 и 2,4 раза. При этом в сердце содержание цитрата уменьшалось в 1,1 раза при использовании мелаксена в дозе 2,5 мг/кг и в 1,3 раза – в дозах 5, 10 и 20 мг/кг. Применение вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг на фоне развития патологии приводило к снижению уровня цитрата в печени и сыворотке крови в 1,4, в почках – в 1,3, в сердце – в 1,2 раза. При действии указанного препарата в дозах 5,0 и 10 мг/кг выявлено снижение концентрации цитрата в печени и сыворотке в 1,5 и 1,9 раза, в почках в 1,6 и 1,8 раза, в сердце в 1,1 и 1,3 раза. Введение вальдоксана в дозе 20 мг/кг способствовало снижению уровня цитрата в печени и почках в 1,3 раза, в сыворотке и сердце в 1,1 раза (рис. 6). Изменение содержания цитрата в сторону контрольных значений при введении мелатонин-корректирующих препаратов животным с СД2, очевидно, свидетельствует о снижении уровня окислительного стресса, что ведет к реконструкции активного центра аконитазы и утилизации цитрата в катализируемой аконитазой реакции.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии способности у эпифамина, мелаксена и вальдоксана оказывать позитивное регулирующее воздействие на свободнорадикальный гомеостаз, снижая степень проявления оксидативного стресса при СД2. Это подтверждается, в частности, значительным снижением показателей БХЛ, отражающих скорость свободнорадикальных процессов, активности каспаз и степени

фрагментации ДНК в исследуемых тканях крыс с СД2 при введении исследуемых препаратов. При этом, наиболее выраженный положительный эффект был отмечен при введении мелаксена. По-видимому, под действием мелатонина, входящего в состав данного препарата, наиболее эффективно реализовывалось регулирующее воздействие на свободнорадикальный гомеостаз в организме животных с патологией. Вероятно, более низкая эффективность эпифамина и вальдоксана может быть связана с тем, что в данном случае требовалось определенное время для усиления синтеза мелатонина в эпифизарной области или же стимуляции его рецептор-опосредованного действия.

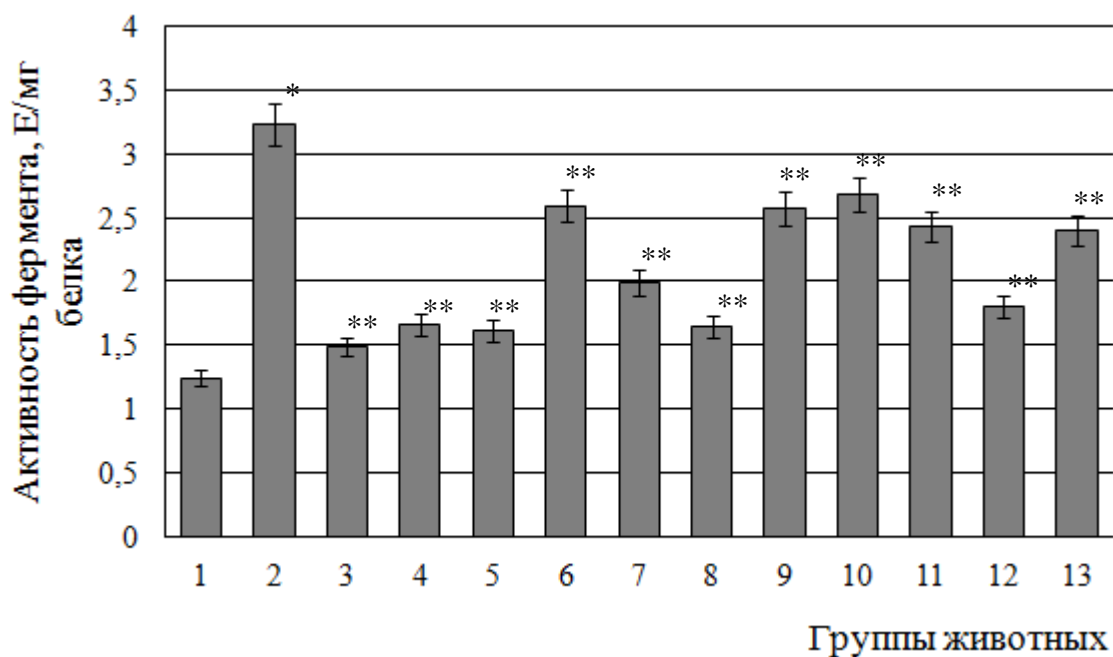
3.3. Оценка антиоксидантного потенциала тканей крыс при сахарном диабете 2 типа и действии мелатонин-корректирующих препаратов.

3.3.1. Анализ активности супероксиддисмутазы и каталазы в печени, почках, сыворотке и сердце крыс с сахарным диабетом 2 типа и введении эпифамина, мелаксена и вальдоксана

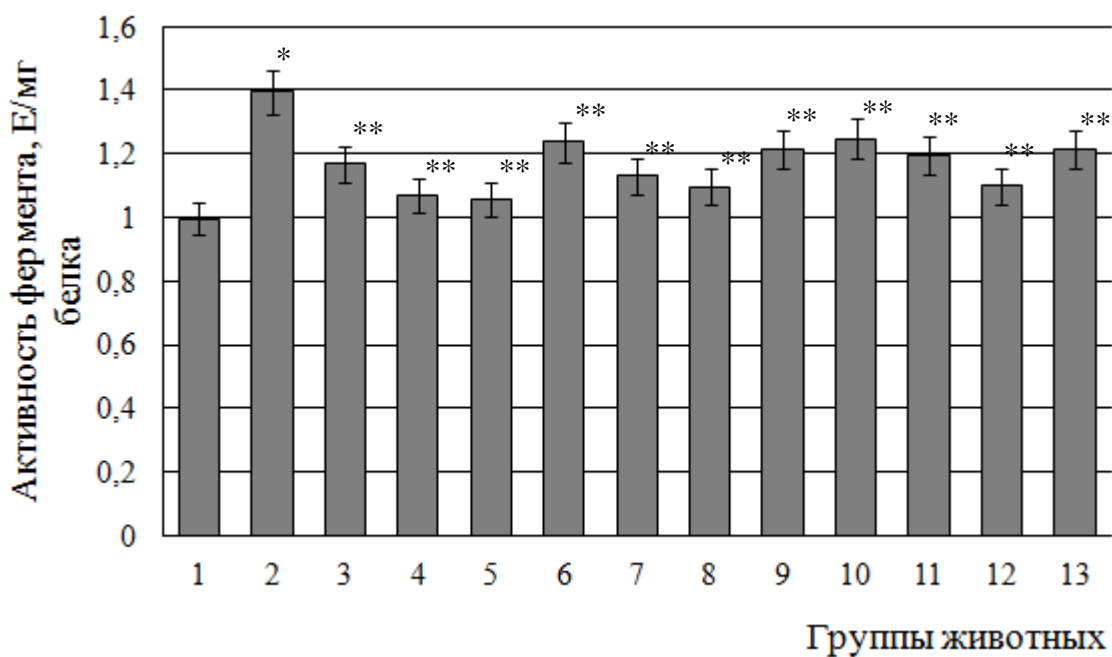
Полученные данные об изменении скорости протекания СРП в тканях животных указывают на необходимость оценки состояния антиоксидантной системы у крыс с СД2 и при введении веществ-протекторов в условиях патологии. В этой связи актуальным является определение активности СОД и каталазы – ключевых ферментов АОС организма, осуществляющих защиту клеток от разрушающего действия АФК.

У животных с экспериментальным СД2 обнаружено увеличение удельной активности СОД в печени в 2,6 раза, в почках – в 1,4 раза, в сыворотке крови – в 1,9 раза в сердце – в 3,3 раза по сравнению с контрольными животными (рис. 7). Кроме того, выявлено возрастание удельной активности каталазы в печени в 2,7 раза, в почках – в 2,2 раза, в сыворотке крови – в 2,7 раза, в сердце – в 2,5 раза (рис. 9). Вероятно, рост активности исследуемых ферментов носит адаптивно-компенсаторный

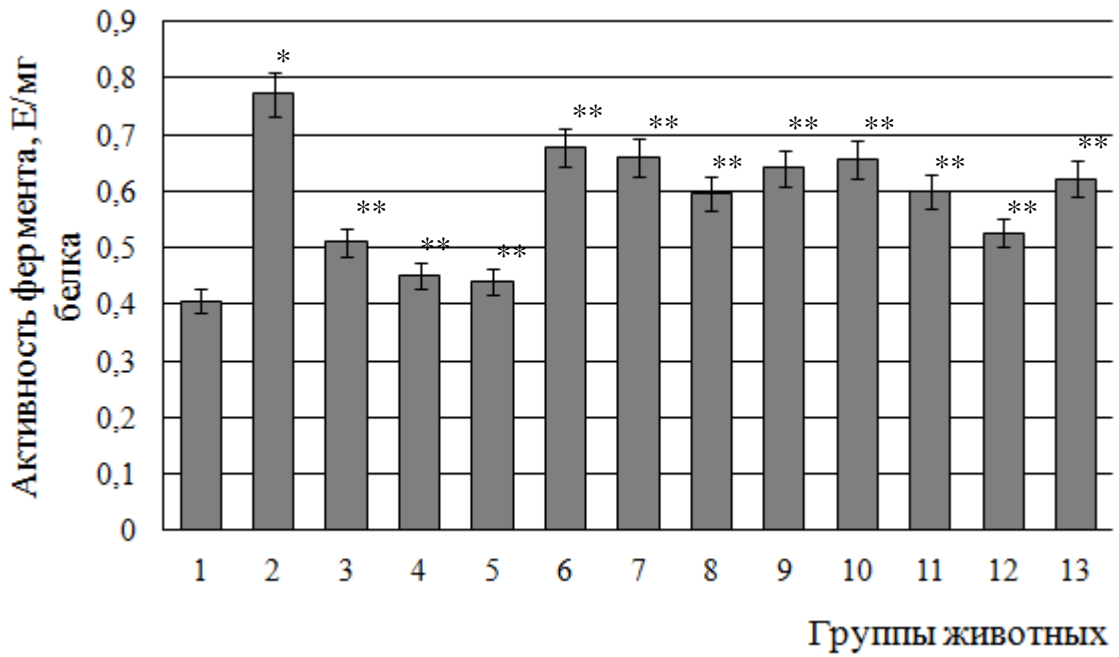
характер в ответ на чрезмерное образование АФК. Известно, что при диабете наблюдается интенсификация генерации $O_2^{\cdot-}$ митохондриями, ксантиноксидазой, цитохромом Р-450, а также НАДН/НАДФН-оксидазой, что может явиться причиной повышения активности СОД и, как следствие, каталазы [19].



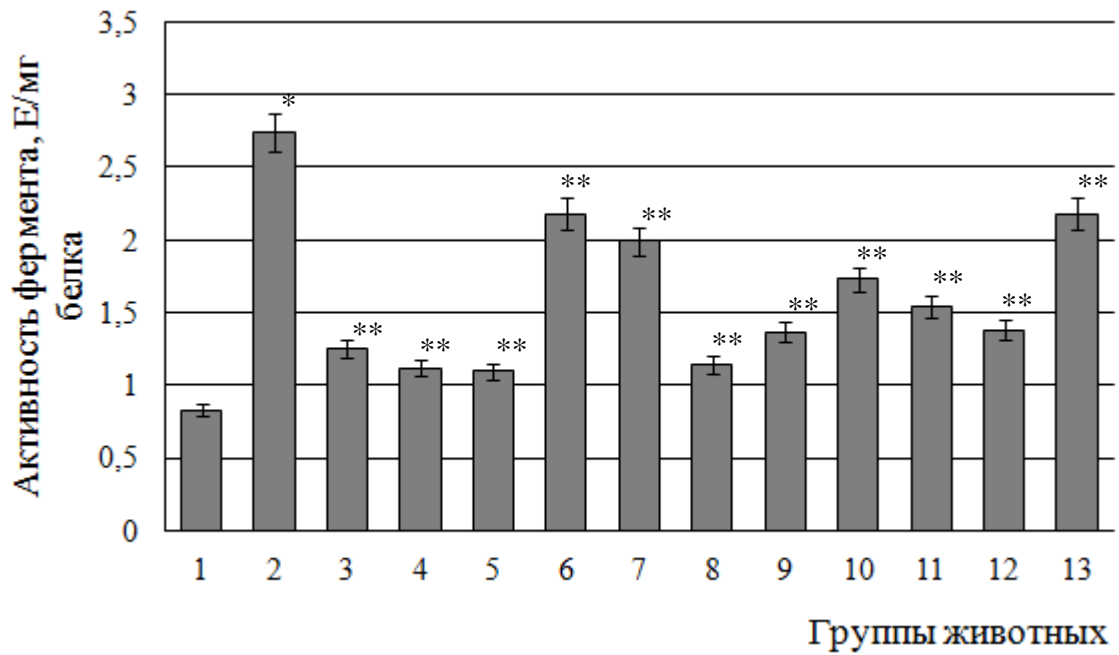
а



б

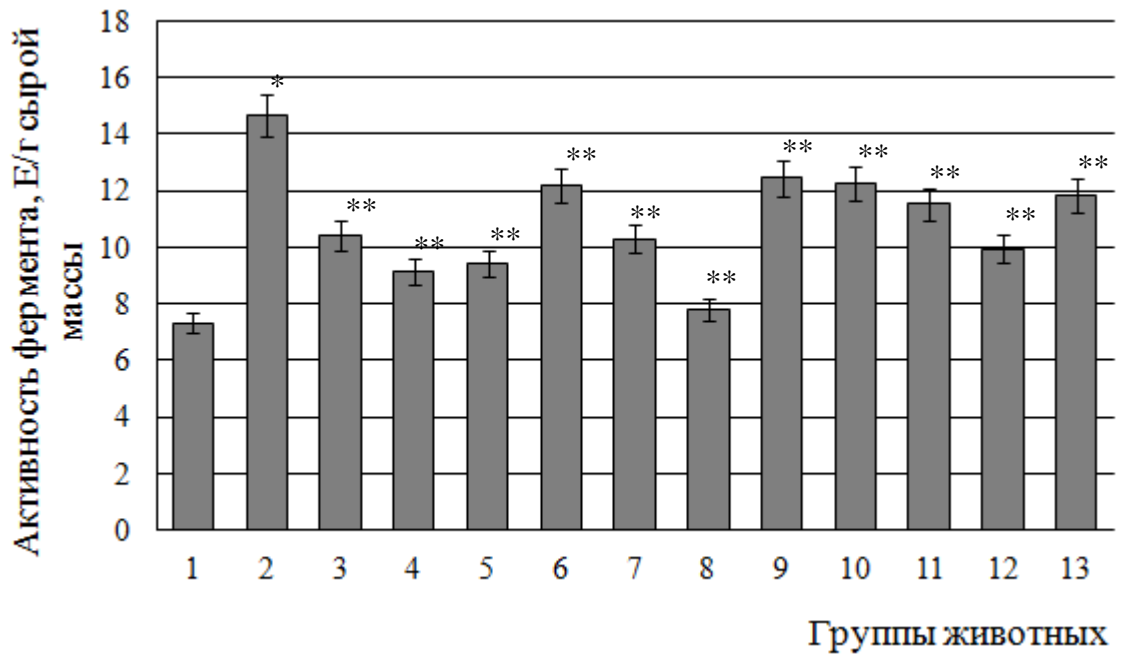


В

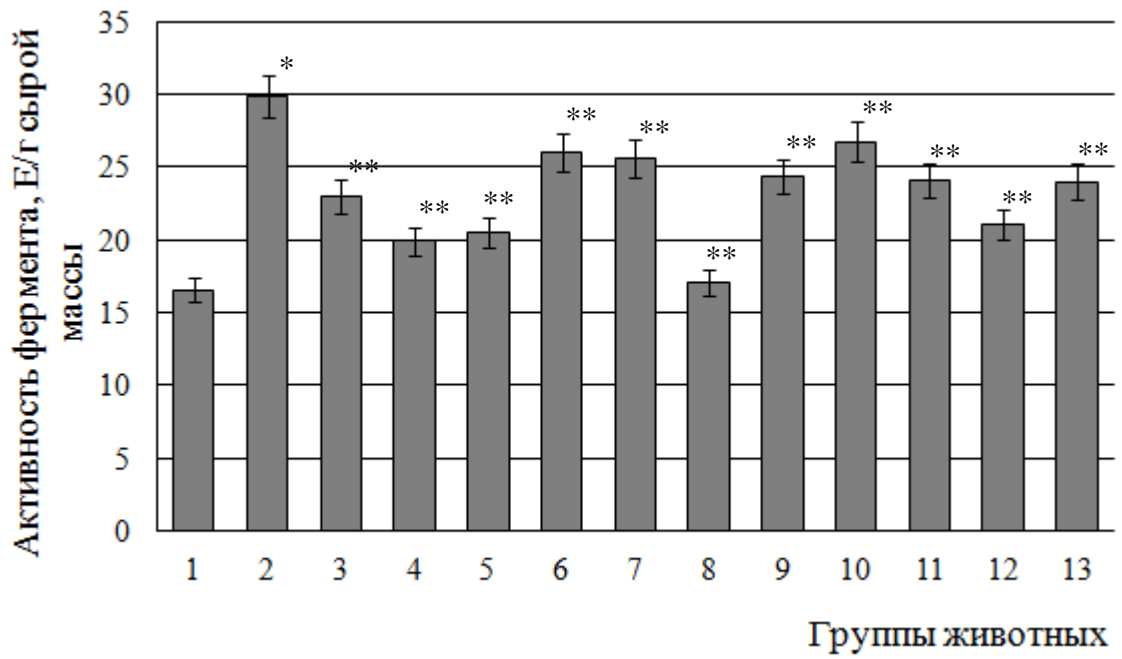


Г

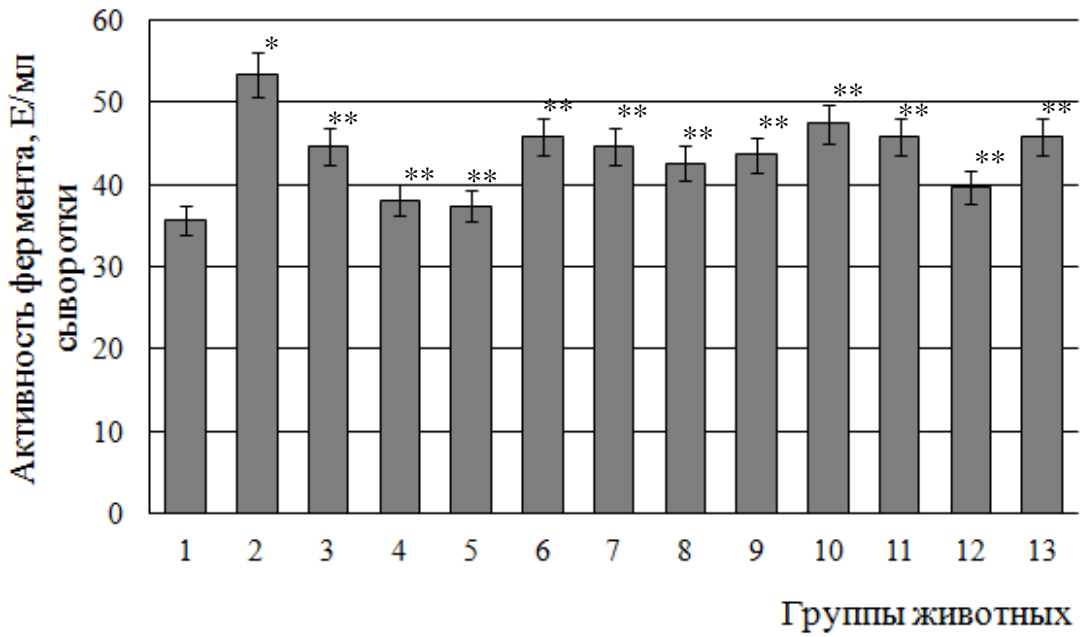
Рис. 7. Активность супероксиддисмутазы, выраженная в Е/мг белка, в печени (а), почках (б), сыворотке (в) и сердце (г) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)



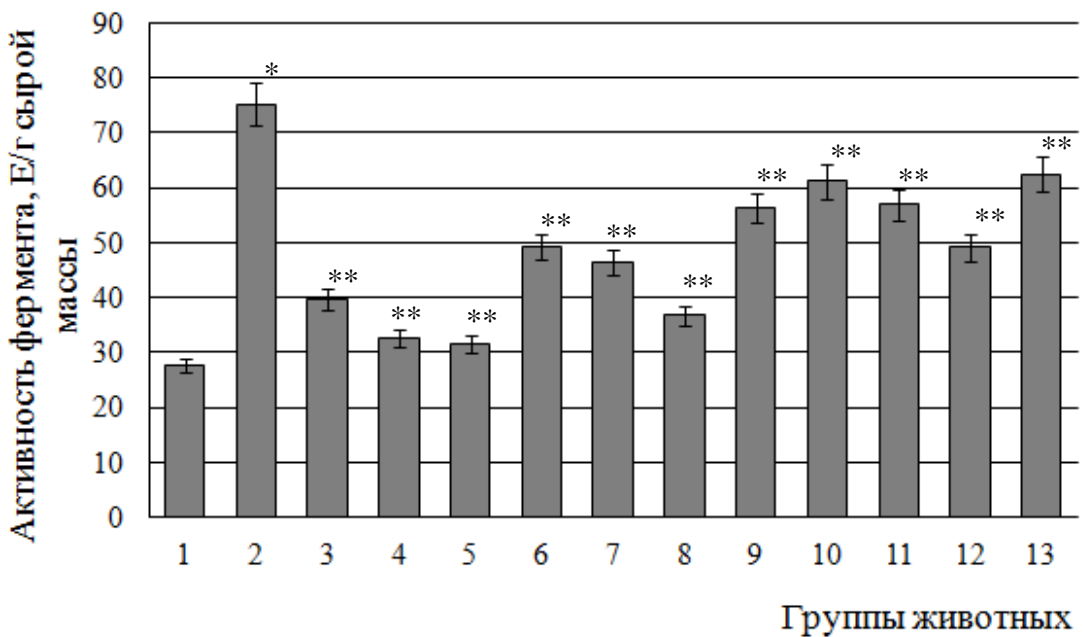
а



б

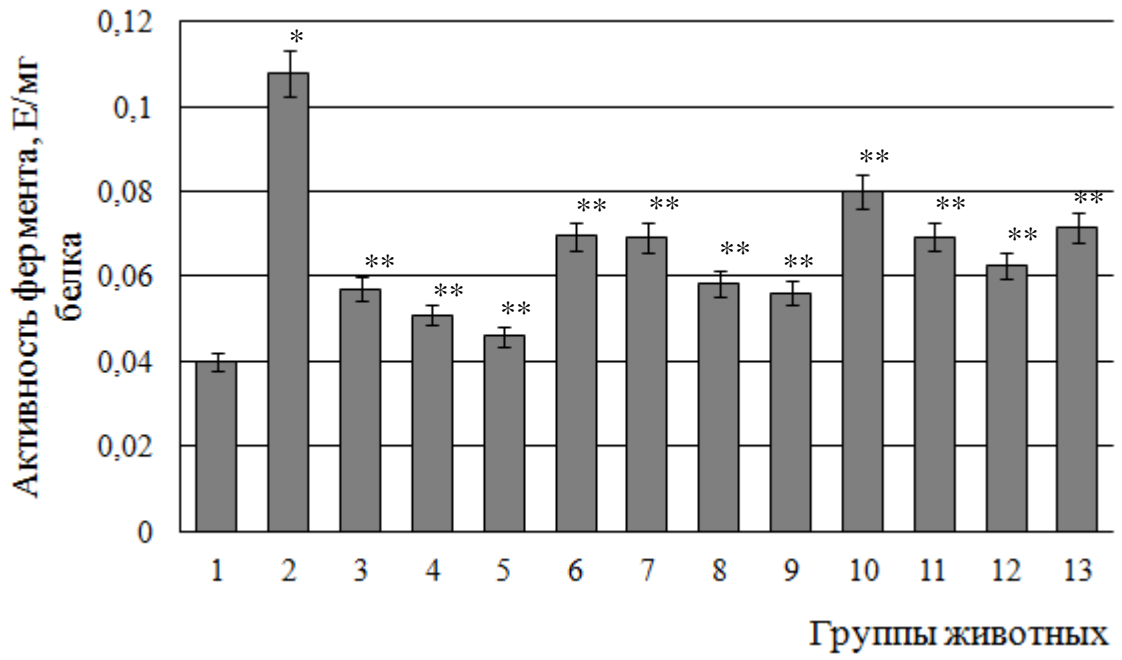


В

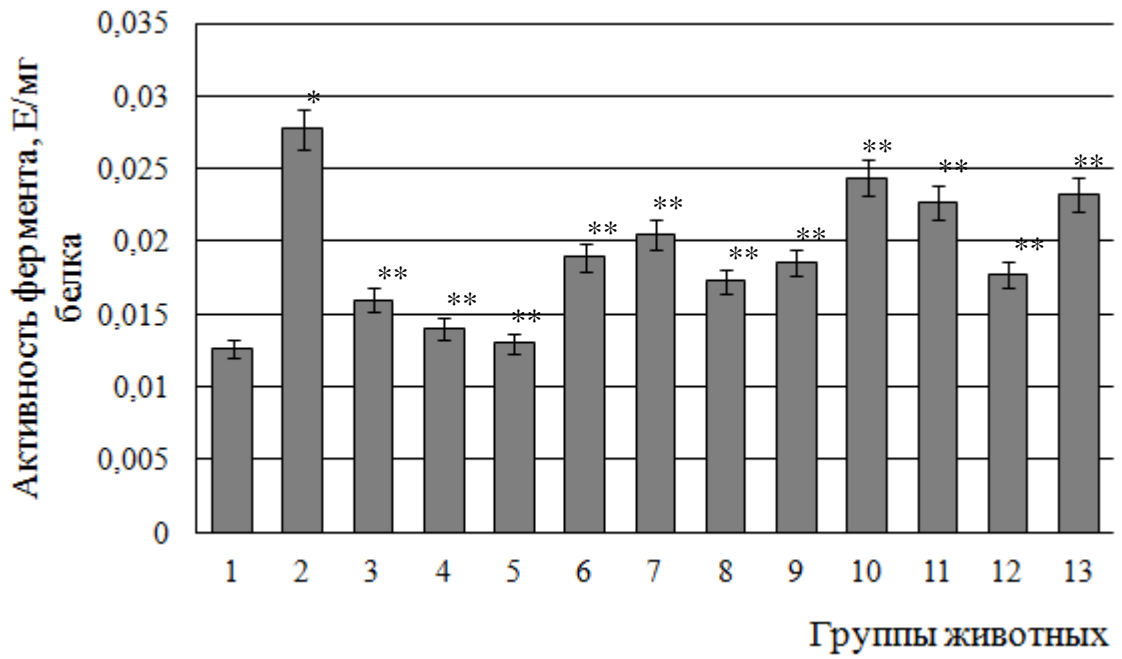


Г

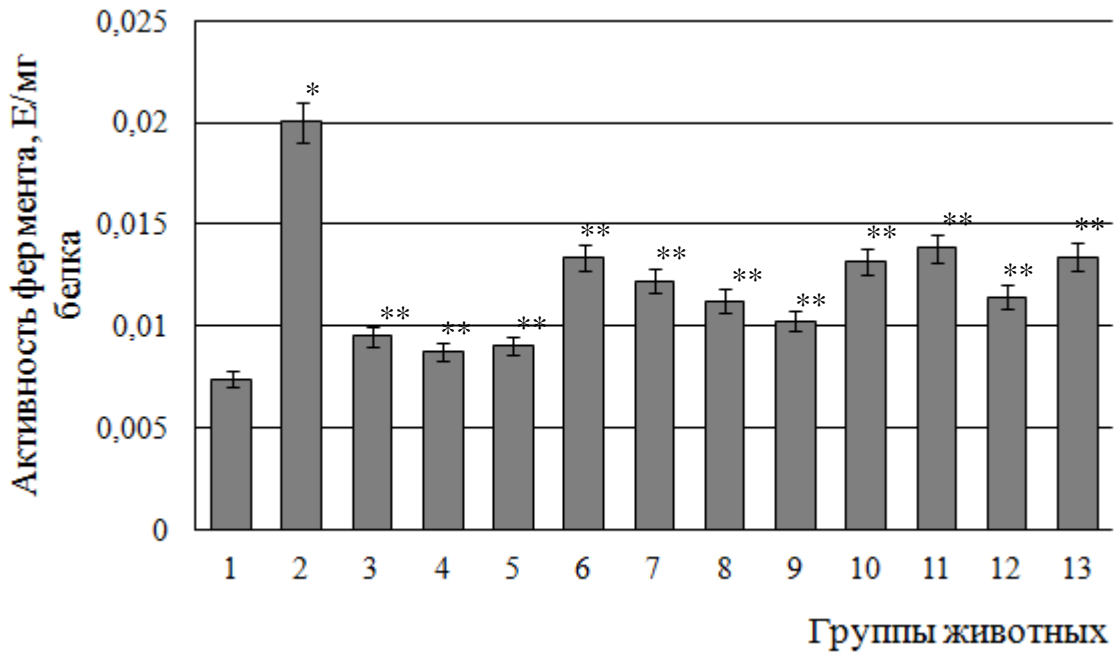
Рис. 8. Активность супероксиддисмутазы, выраженная в Е/г сырой массы, в печени (а), почках (б), сердце (г) и в Е/мл в сыворотке крови (в) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)



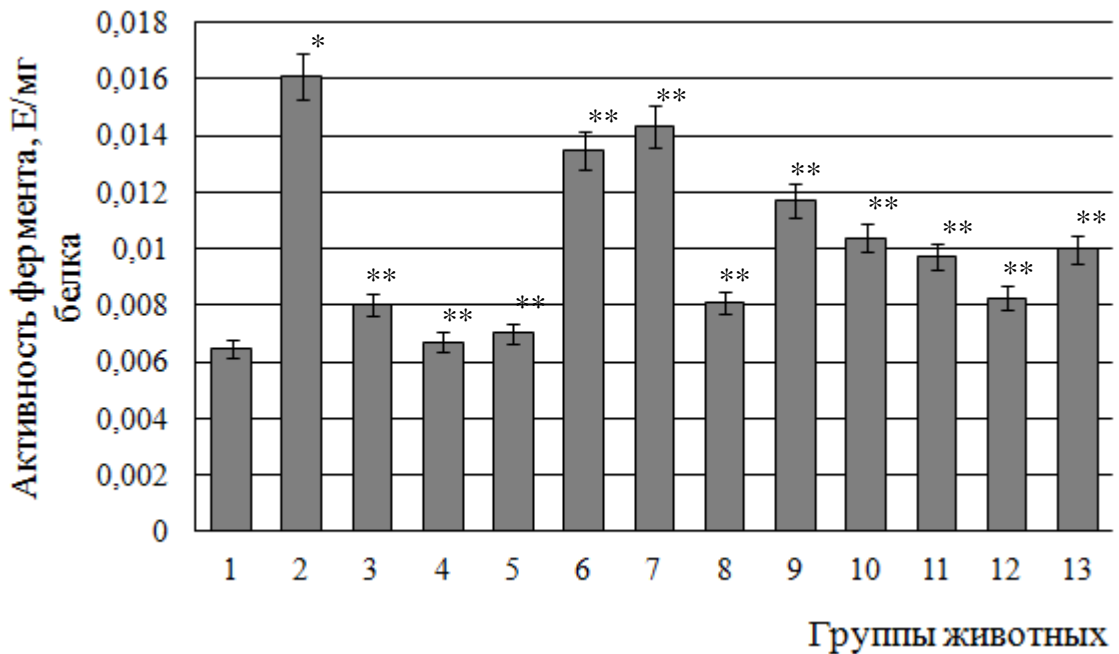
а



б

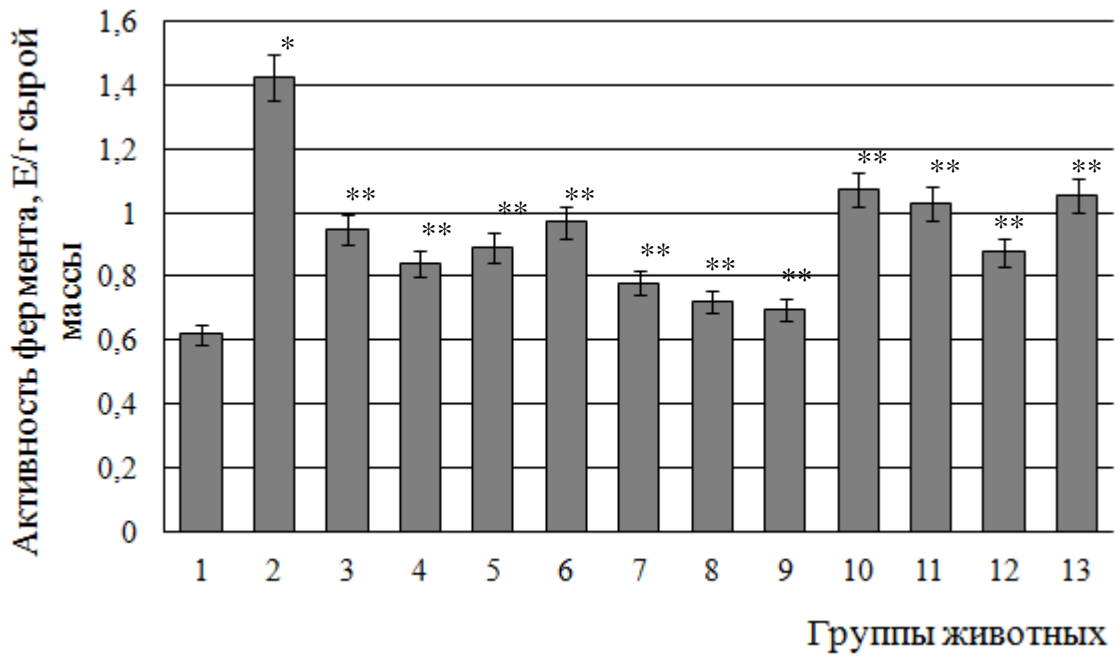


В

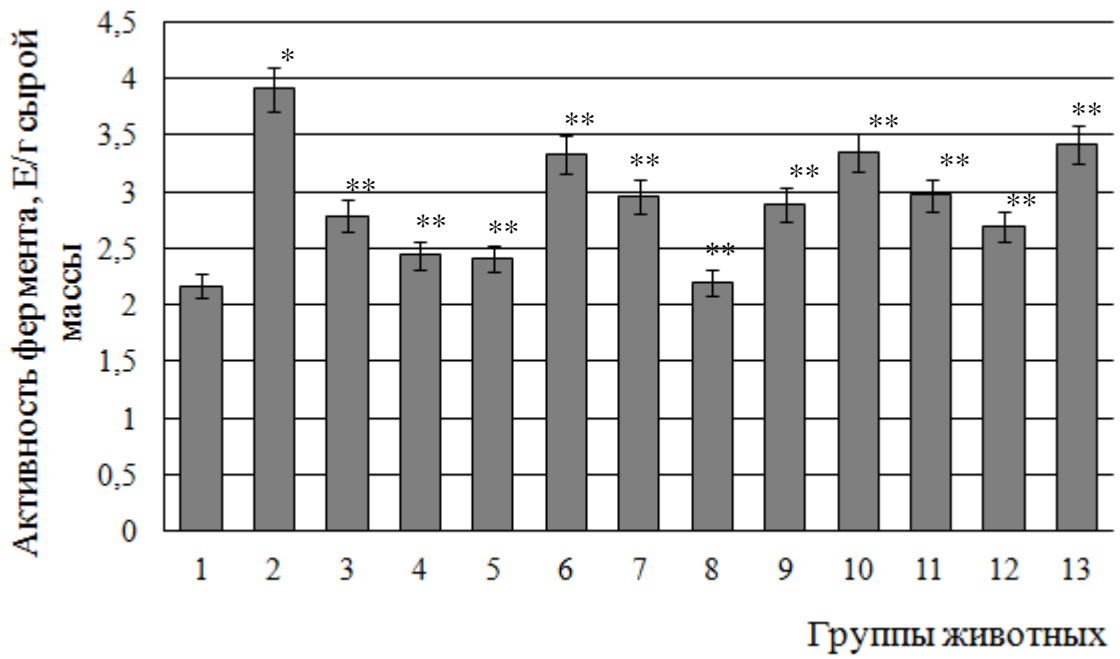


Г

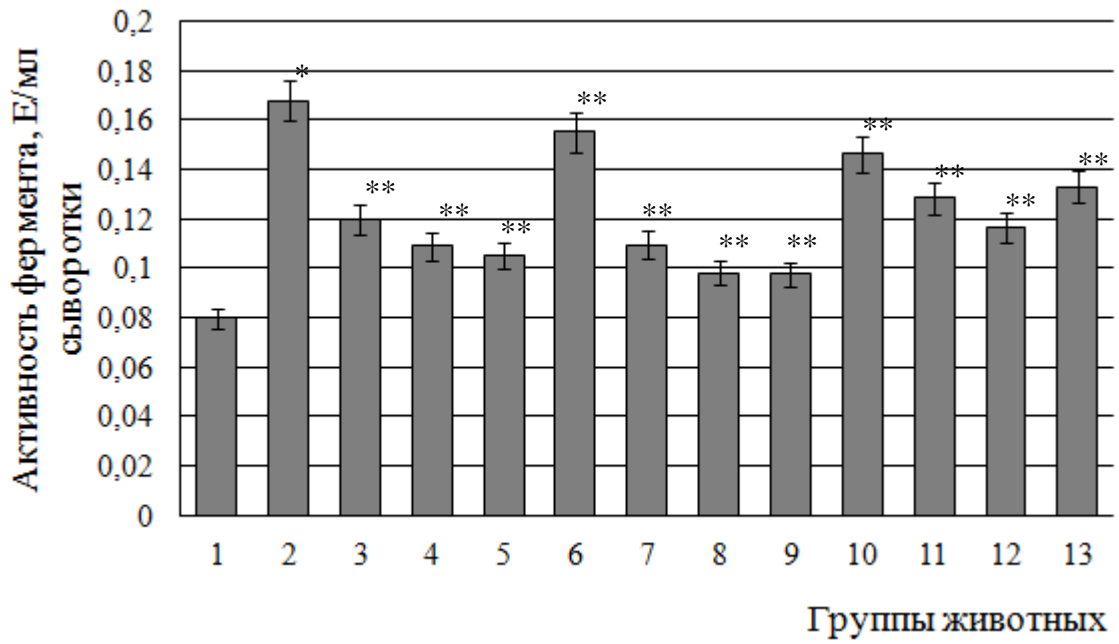
Рис. 9. Активность каталазы, выраженная в Е/мг белка, в печени (а), почках (б), сыворотке (в) и сердце (г) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)



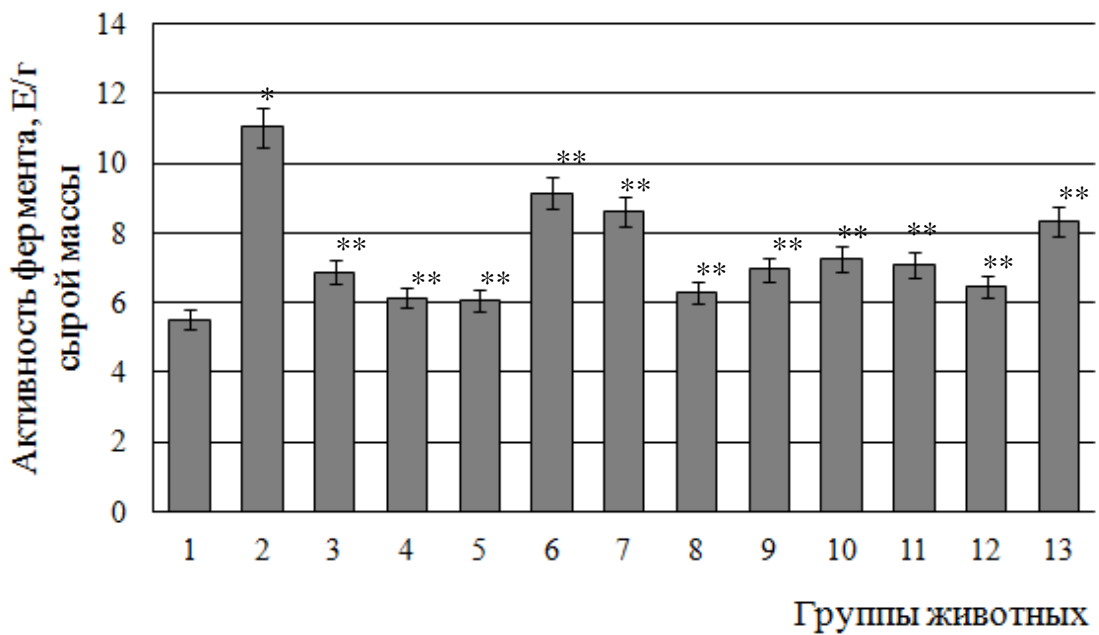
а



б



в



г

Рис. 10. Активность каталазы, выраженная в Е/г сырой массы, в печени (а), почках (б), сердце (г) и в Е/мл в сыворотке крови (в) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)

При введении эпифамина, мелаксена и вальдоксана животным с СД2 отмечалось снижение активности СОД по сравнению с активностью при СД2. Так, удельная активность СОД при действии эпифамина в дозе 1,2 мг/кг снижалась соответственно в печени и сердце крыс в 2,2 раза, в почках в 1,2 раза, в сыворотке крови в 1,5 раза. При действии эпифамина в дозе 2,5 мг/кг и 5,0 мг/кг активность фермента была ниже в печени в 1,9 и 2,0 раза, в почках в 1,3 раза, в сыворотке в 1,7 и 1,8 раза, в сердце 2,4 и 2,5 раза по сравнению с уровнем при патологии (рис. 7). При этом активность, выраженная в виде Е/г сырой массы, также снижалась при действии эпифамина в дозе 1,2 мг/кг в печени и почках на 40% и 30%, в дозе 2,5 на 60% и 50%, в дозе 5,0 мг/кг на 55% и 46%; при этом активность фермента в сердце при введении эпифамина в дозах 1,2, 2,5 и 5,0 мг/кг снижалась в 1,9, 2,3 и 2,4 раза по сравнению с группой животных с СД2. Активность СОД в сыворотке крови, выраженная в Е/мл, уменьшалась при действии эпифамина в дозе 1,2 мг/кг на 20%, в дозе 2,5 мг/кг на 40% и в дозе 5,0 мг/кг на 43%. Наряду с этим выявлено, что введение мелаксена в дозе 2,5 мг/кг животным с СД2 приводило к снижению активности фермента в печени в 1,2 раза, в сердце в 1,3 раза, в почках и сыворотке в 1,1 раза. При воздействии мелаксена в дозах 5,0, 10 и 20 мг/кг удельная активность СОД уменьшалась соответственно в печени в 1,6, 2,0 и 1,3 раза, в почках в 1,2, 1,3 и 1,1 раза, в сердце в 1,4, 2,4 и 2,0 раза. Также, наблюдалось снижение активности фермента и в сыворотке крови в 1,2 раза при введении мелаксена в дозах 5,0 и 20 мг/кг и в 1,3 раза – в дозе 10 мг/кг (рис. 7). Изменение активности СОД, выраженной в Е/г сырой массы и в Е/мл сыворотки, при введении указанных доз мелаксена характеризовалось сходной динамикой (рис. 8). Применение вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг на фоне развития СД2 приводило к снижению удельной активности СОД в печени на 21%, в почках на 12%, в сыворотке крови на 18%, в сердце на 58%, в дозе 5,0 мг/кг – на 33%, 17%, 29%, 77%, соответственно. При этом, введение вальдоксана в дозе 10 мг/кг крысам с СД2 способствовало снижению активности фермента в печени в 1,8, в почках в 1,3 раза, в

сыворотке в 1,5 раза и в сердце в 2,0 раза, а при использовании дозы 20 мг/кг – в 1,4 раза в печени, в 1,3 раза в сердце и в 1,2 раза в почках и сыворотке (рис. 7). Подобные изменения были характерны и для активности фермента, выраженной в Е/г сырой массы и в Е/мл сыворотки (рис. 8).

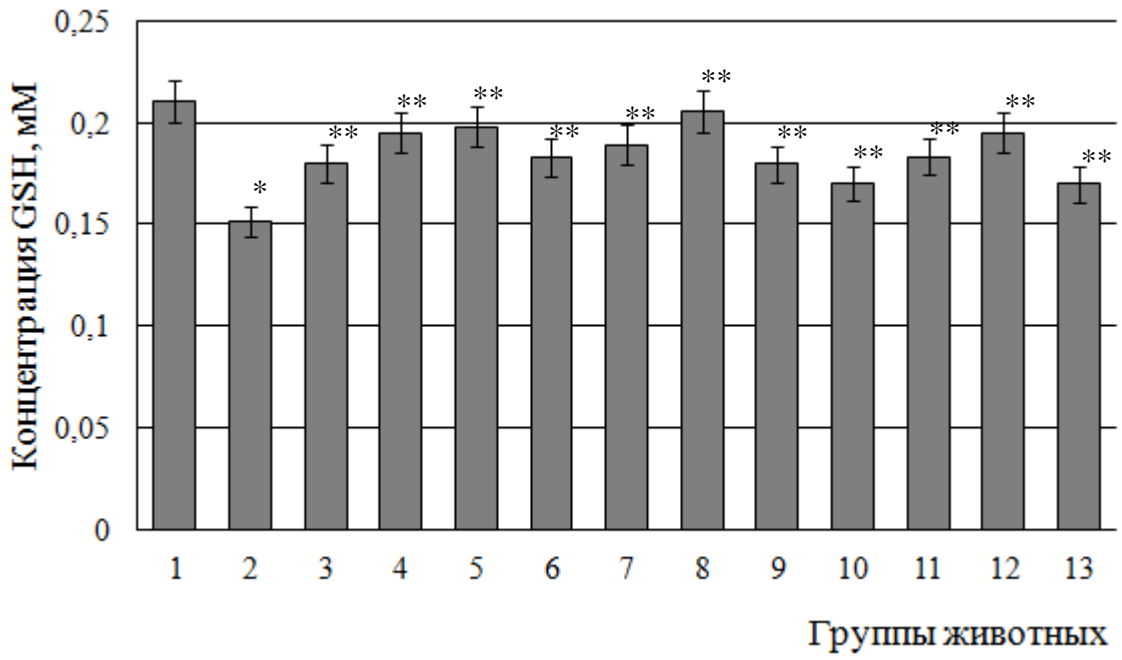
Также при введении мелатонин-корректирующих препаратов было обнаружено снижение активности каталазы по сравнению с показателями при СД2. Удельная активность каталазы при действии эпифамина в дозе 1,2 мг/кг снижалась в печени, почках, сыворотке крови и сердце крыс соответственно в 1,9, 1,7, 2,1 и 2,0 раза, при действии эпифамина в дозе 2,5 мг/кг – соответственно в 2,1, 2,0, 2,3 и 2,4 раза. При использовании эпифамина в дозе 5,0 мг/кг наблюдалось снижение активности фермента в печени и сердце в 2,3 раза, в почках в 2,1 раза, в сыворотке в 2,2 раза (рис. 9). Также, наблюдалось снижение удельной активности каталазы при действии мелаксена в дозах 2,5 и 5,0 мг/кг в печени на 55% и 56%, в дозе 10 и 20 мг/кг на 85% и 93%. При этом, активность фермента в почках при введении мелаксена в дозах 2,5 и 20 мг/кг снижалась в 1,5 раза, в дозе 5,0 мг/кг – в 1,4 раза, в дозе 10 мг/кг – в 1,6 раза. Схожие изменения удельной активности отмечены в сыворотке крови и сердце при введении указанного препарата в дозах 2,5, 5,0, 10 и 20 мг/кг – активность снижалась соответственно в 1,5, 1,6, 1,8 и 1,9 раза (для сыворотки) в 1,2, 1,1, 2,0 и 1,4 раза (для сердца) (рис. 9). Изменение активности каталазы, выраженной в Е/г сырой массы и Е/мл сыворотки, характеризовалось подобной динамикой, что и изменение удельной активности фермента. Введение вальдоксана в дозах 2,5, 5, 10 и 20 мг/кг приводило к снижению удельной активности каталазы в печени соответственно на 35%, 56%, 73% и 51%. В сыворотке крови и сердце активность фермента снижалась при введении вальдоксана в дозах 2,5 и 20 мг/кг в 1,5 и 1,6 раза соответственно, в дозе 5,0 мг/кг в 1,4 и 1,7 раза, в дозе 10 мг/кг в 1,8 и 1,9 раза. Также, удельная активность фермента уменьшалась в почках животных с СД2, которым вводили вальдоксан в дозе 2,5 мг/кг на 14%, в дозе 5,0 мг/кг на 23%, в дозе 10 мг/кг на 57%, в дозе 20 мг/кг на 19%

(рис. 9). Активность каталазы, выраженная в виде Е/г сырой массы, изменялась сходным образом. Так, в печени почках и сердце при действии вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг происходило снижение активности в 1,3, 1,2 и 1,5 раза соответственно, в дозе 5 мг/кг – в 1,4, 1,3 и 1,6 раза, в дозе 10 мг/кг – в 1,6, 1,5 и 1,7 раза. В группе животных с СД2, которые получали инъекции вальдоксана в дозе 20 мг/кг, активность фермента снижалась в 1,3 раза в печени и сердце и в 1,1 раза в почках. При этом активность фермента в сыворотке крови, выраженная в Е/мл, снижалась на 15% при действии вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг, на 31% - в дозе 5,0 мг/кг, на 44% – в дозе 10 мг/кг, на 26% – в дозе 20 мг/кг (рис. 10). Полученные результаты изменения активности СОД и каталазы при введении эпифамина, мелаксена и вальдоксана, вероятно, обусловлены корригированием уровня и эффективности действия мелатонина. Известно, что в состав мелаксена входит мелатонин, а эпифамин способен стимулировать синтез данного гормона, повышая тем самым антиоксидантный потенциал клеток. Вальдоксан, являясь селективным агонистом мелатониновых рецепторов, способен имитировать эффекты данного гормона и снижать интенсивность протекания СРП. Таким образом, исследуемые препараты, нейтрализуя АФК, снижают нагрузку на исследуемые антиоксидантные ферменты [228]. Кроме того, в литературе имеются сведения о том, что мелатонин при окислительном стрессе защищает молекулу каталазы от свободнорадиального повреждения [194]. Можно предполагать, что при повышении дозы мелатонина снижение активности антиоксидантных ферментов вследствие уменьшения интенсивности СО частично уравновешивается активацией данных ферментов вследствие их индукции под действием гормона [246].

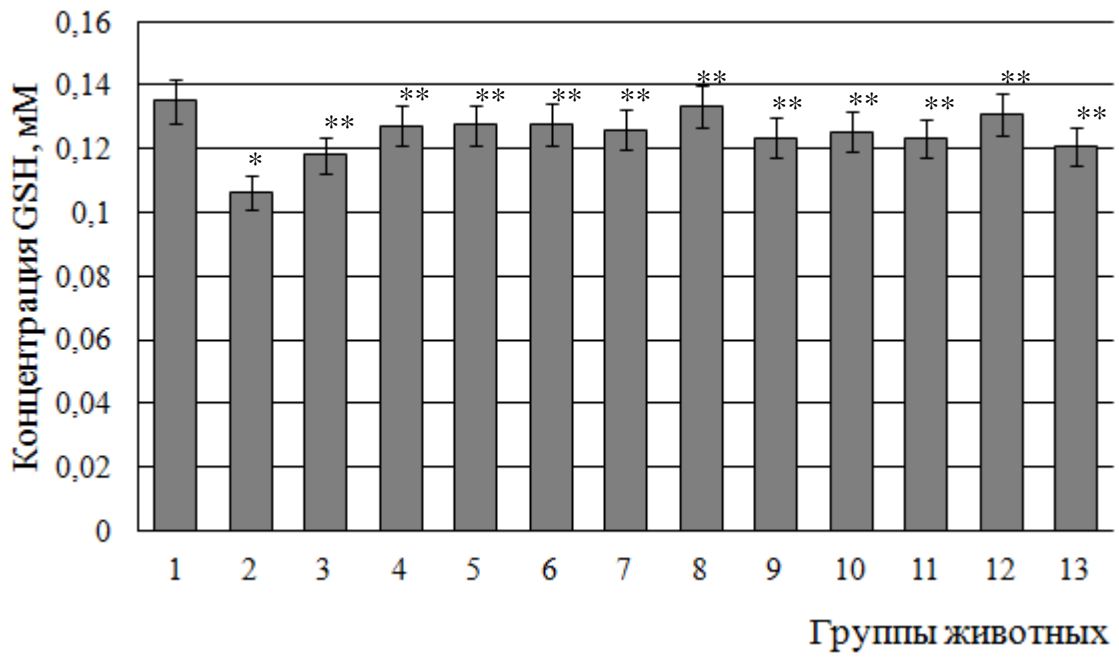
3.3.2. Влияние мелатонин-корректирующих препаратов на активность глутатионового звена антиоксидантной защиты в тканях крыс при сахарном диабете 2 типа

Одной из ключевых линий защиты организма от чрезмерного образования активных кислородных метаболитов, имеющего место при развитии патологического состояния, выступает глутатионовая АОС. Она включает в себя как сам глутатион, так и ферменты, использующие его в качестве субстрата для детоксикации АФК. Известно, что GSH способен непосредственно нейтрализовать свободные радикалы, в том числе супероксид и гидроксил-радикал. При этом происходит окисление его цистеиновой группы и образуется неактивный дисульфид – GSSG. Реакция восстановления GSSG до GSH катализируется ГР, использующей НАДФН как источник восстановительных эквивалентов, окисляя его до НАДФ+. Совместно с ГР функционирует ГП, осуществляя глутатионовый редокс-цикл.

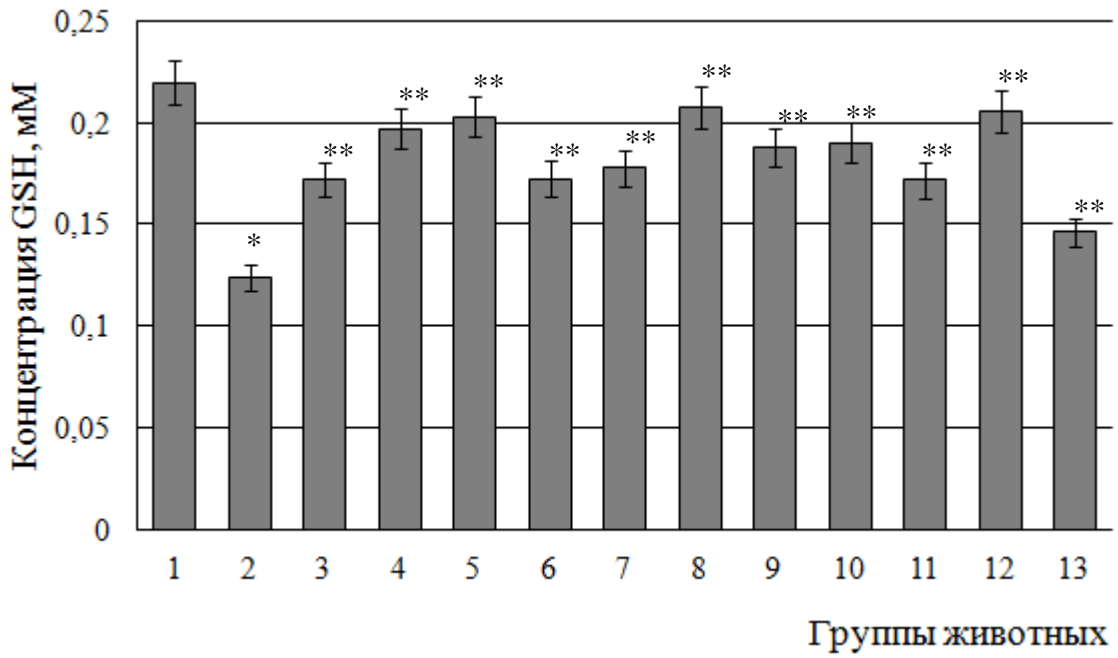
Результаты проведенных исследований показали, что при СД2 у крыс наблюдается снижение содержания GSH в печени в 1,4, в почках – в 1,3, в сыворотке – в 1,8 и в сердце – в 1,5 раза относительно значений показателя у крыс контрольной группы (рис. 11).



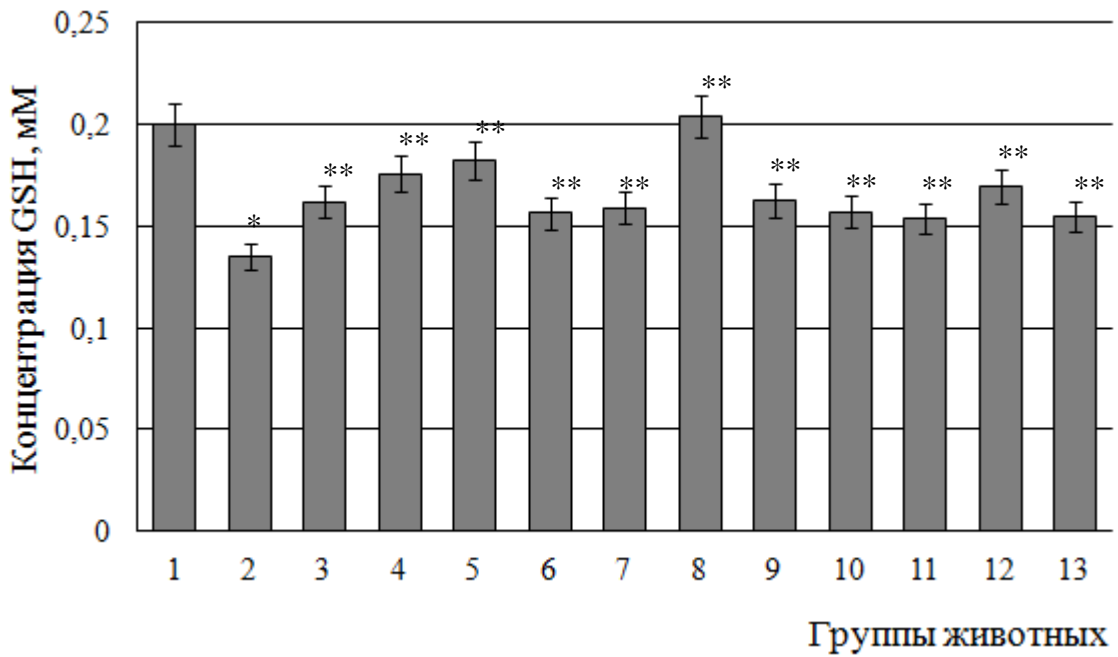
а



б



В

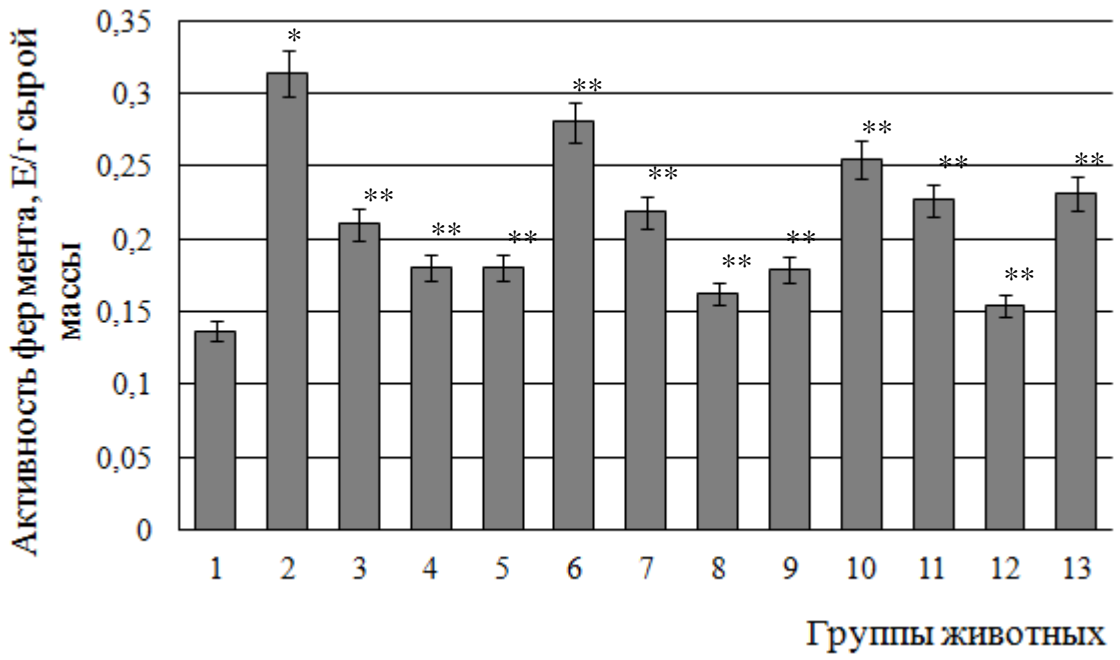


Г

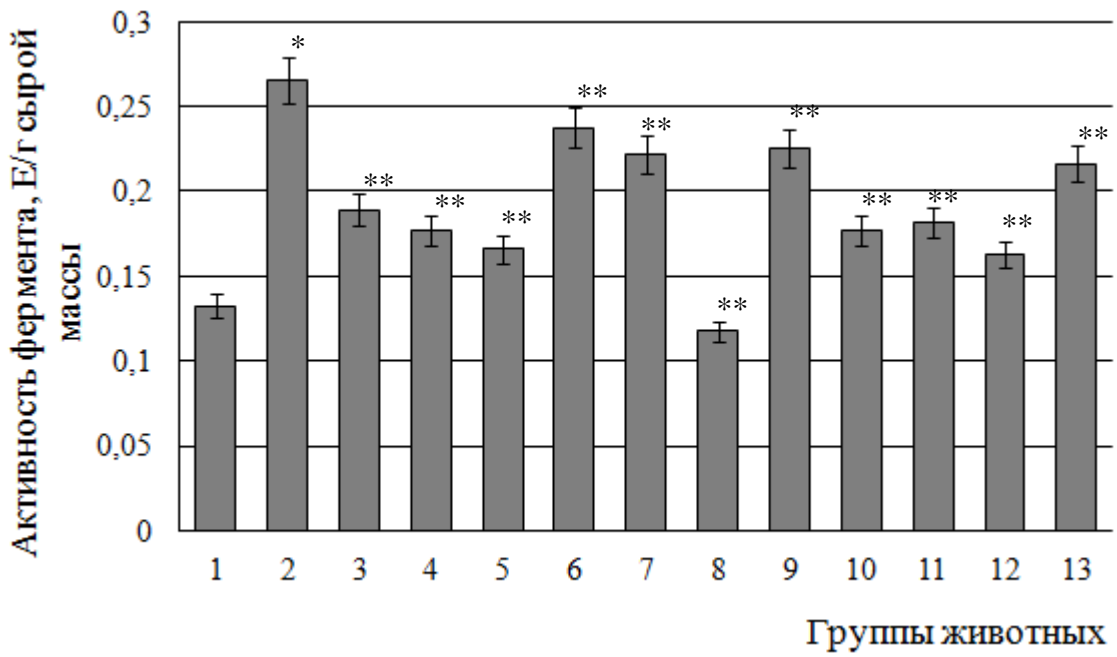
Рис. 11. Содержание восстановленного глутатиона в печени (а), почках (б), сыворотке (в) и сердце (г) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)

Вероятно, восстановленная форма данного антиоксиданта расходовалась на обезвреживание свободнорадикальных соединений и на поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза клетки, нарушенного при патологии. Кроме того, причиной падения концентрации глутатиона может быть снижение интенсивности функционирования пентозофосфатного пути при СД, вследствие чего уменьшается доступность НАДФН, необходимого для регенерации восстановленного глутатиона. Снижение концентрации глутатиона, согласно литературным данным, также было выявлено в плазме и эритроцитах больных с СД1 и длительно протекающим СД2 [117]. Вместе с тем, выявлено увеличение каталитической активности ГП и ГР относительно контрольных значений. Так, активность ГП, выраженная в виде Е/г сырой массы, увеличивалась в печени в 2,3 раза, в почках – в 2,0 раза, в сердце – в 1,2 раза, активность ГР увеличивалась в печени в 1,7 раза, в почках – в 1,6 раза, в сердце – в 1,5 раза. Выявлено также возрастание активности ферментов, выраженной в виде Е/мл сыворотки крови: ГП – в 2,5 раза, ГР – в 1,9 раза (рис. 12, 14). При этом изменение удельной активности указанных ферментов характеризовалось сходной тенденцией (рис. 13, 15).

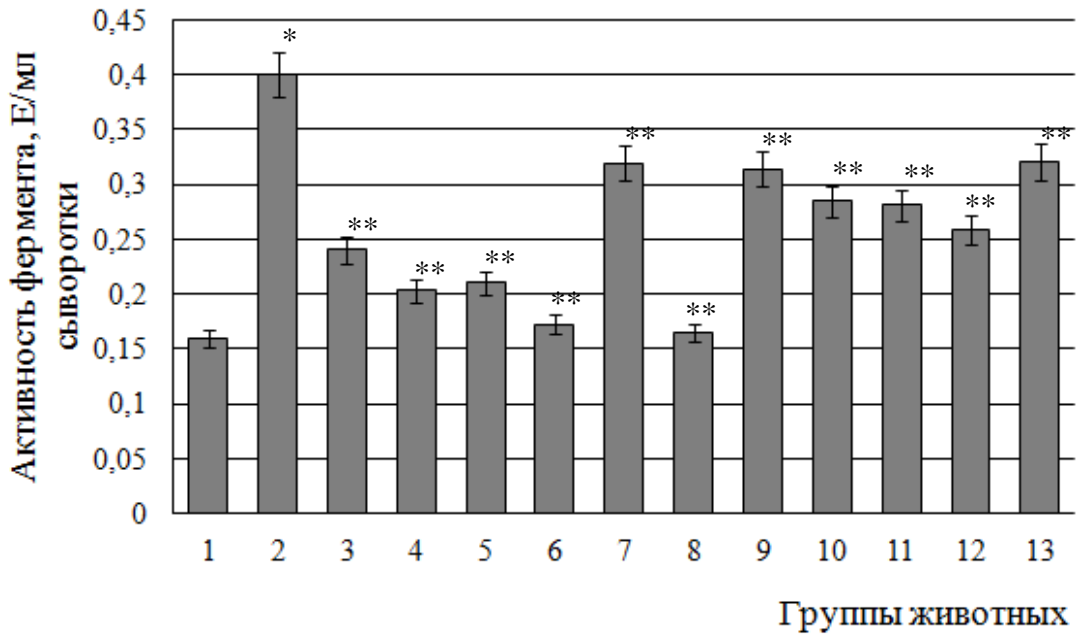
Результаты исследований свидетельствуют об увеличении активности ГТ в тканях крыс с СД2 относительно контрольных значений. Так, активность ГТ, выраженная в виде Е/г сырой массы, увеличивалась в печени в 1,5 раза, в почках – в 1,6 раза, в сердце – в 1,3 раза. В сыворотке крови, активность, выраженная в виде Е/мл, возрастала в 1,5 раза (рис. 16). Изменения удельной активности фермента демонстрировали ту же тенденцию (рис. 17).



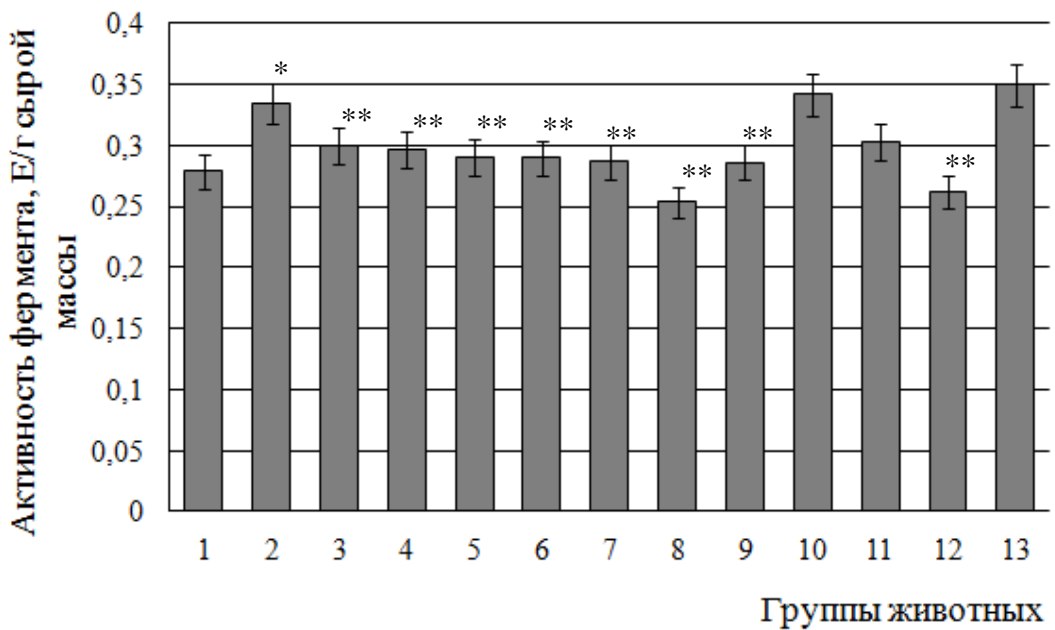
а



б

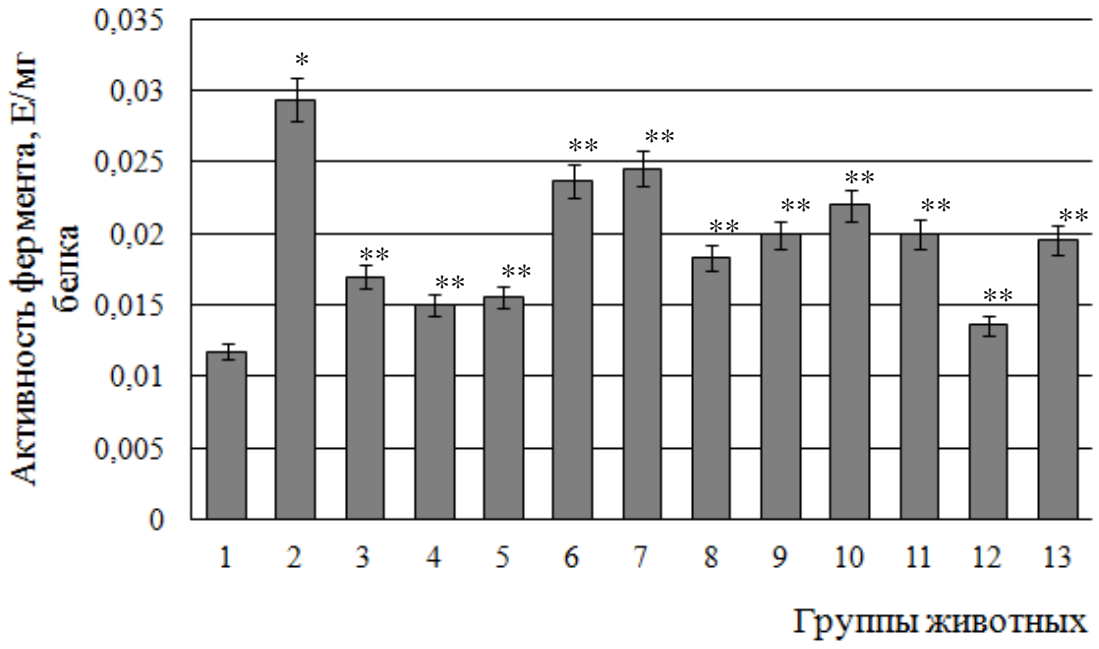


в

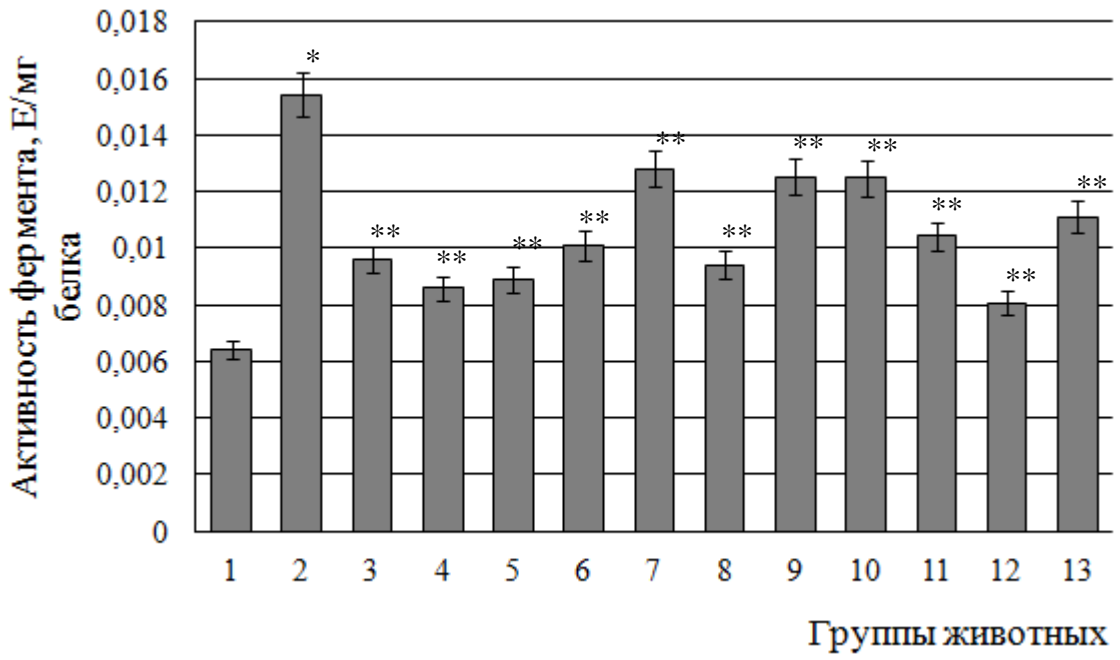


г

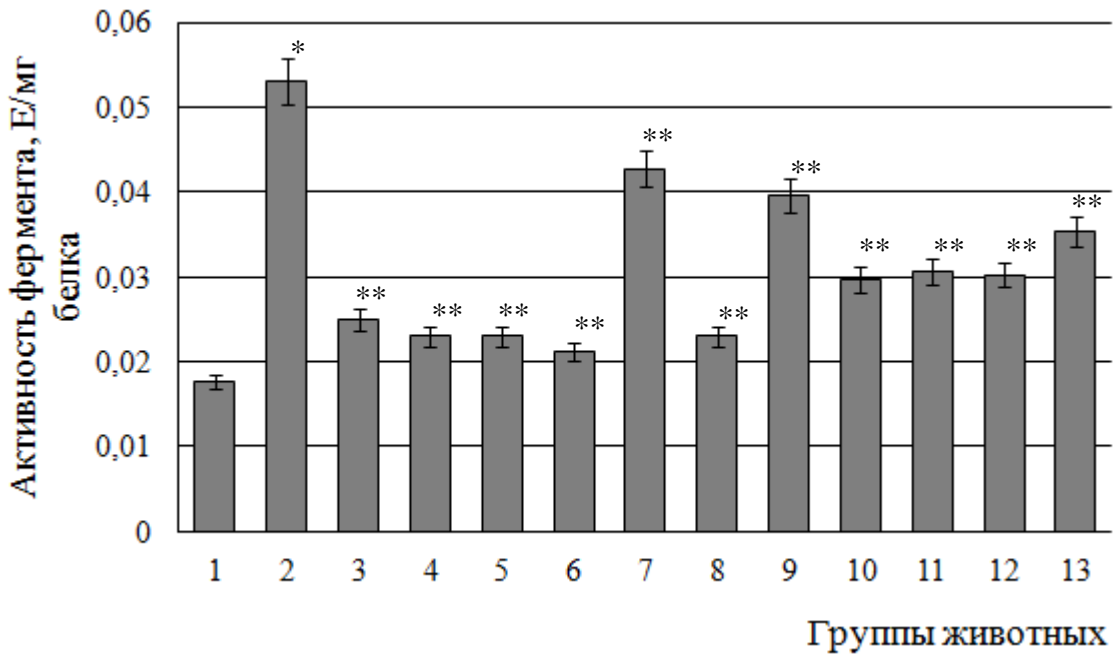
Рис. 12. Активность глутатионпероксидазы, выраженная в Е/г сырой массы, в печени (а), почках (б), сердце (г) и в Е/мл в сыворотке крови (в) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)



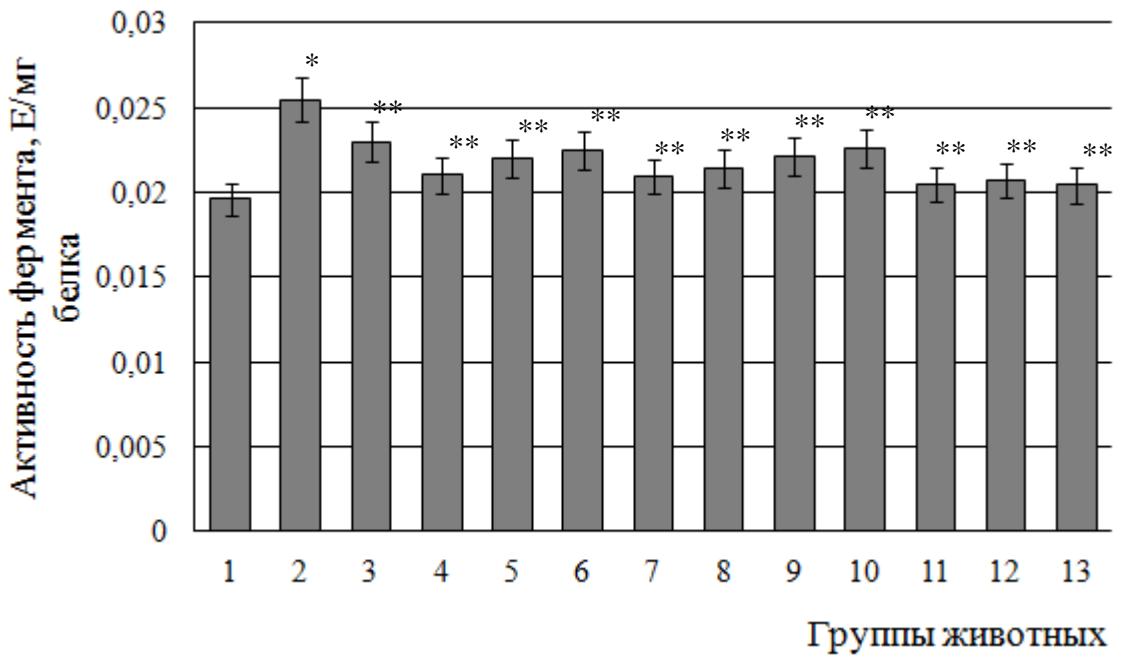
а



б

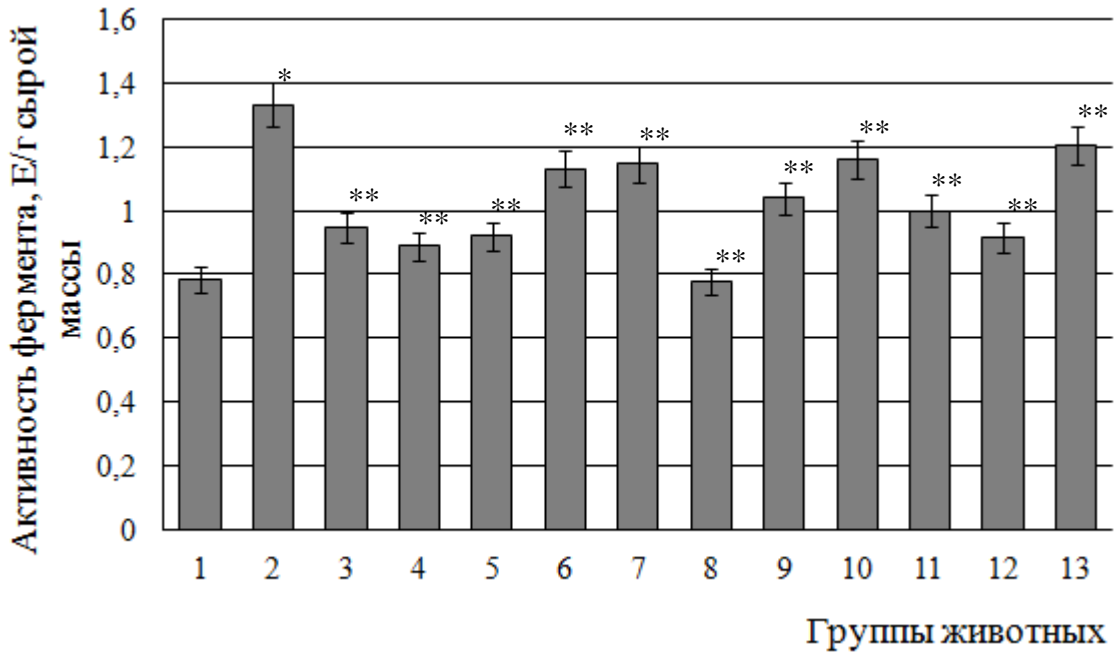


В

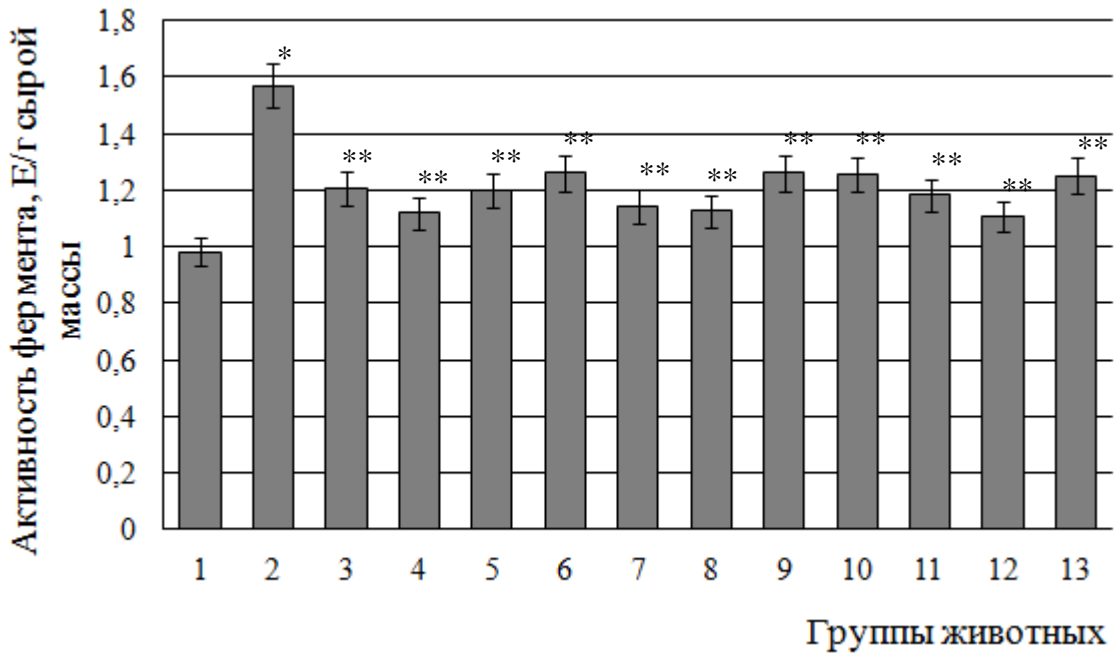


Г

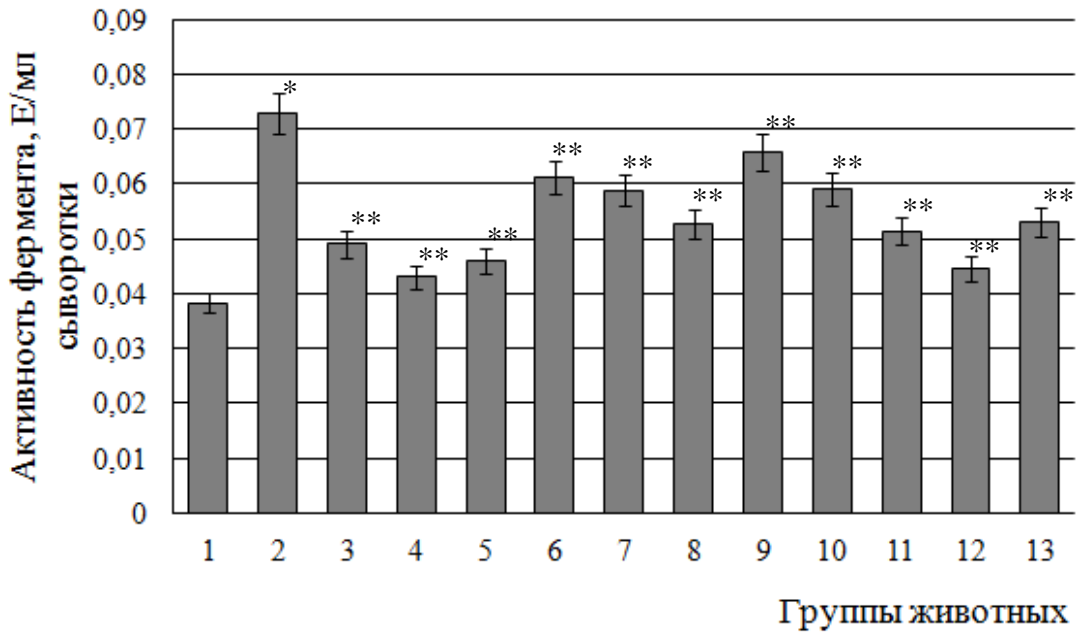
Рис. 13. Активность глутатионпероксидазы, выраженная в Е/мг белка, в печени (а), почках (б), сыворотке (в) и сердце (г) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)



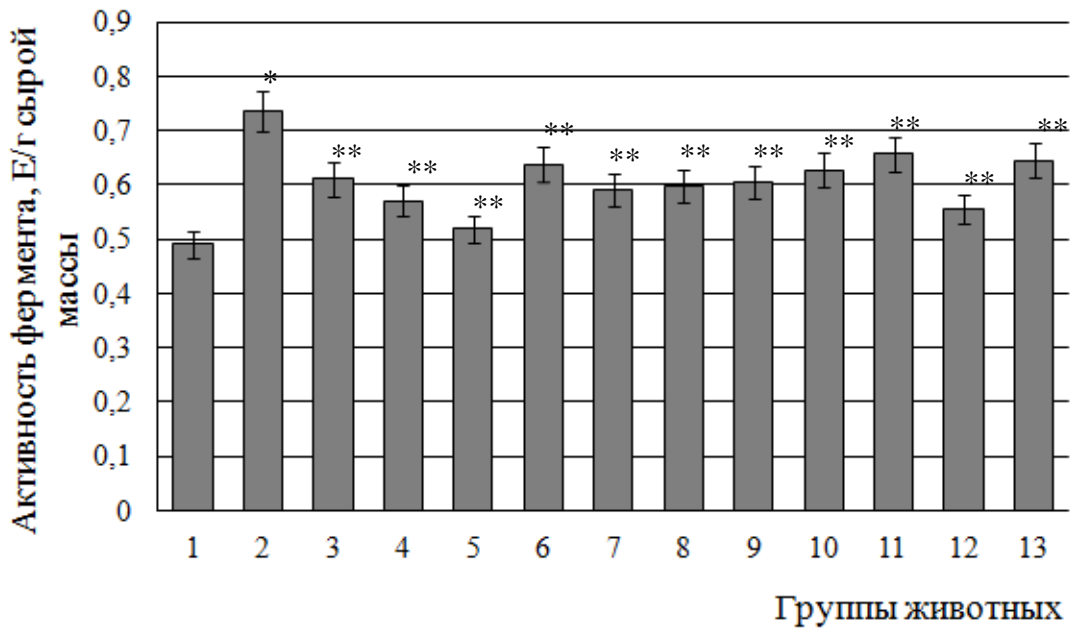
а



б

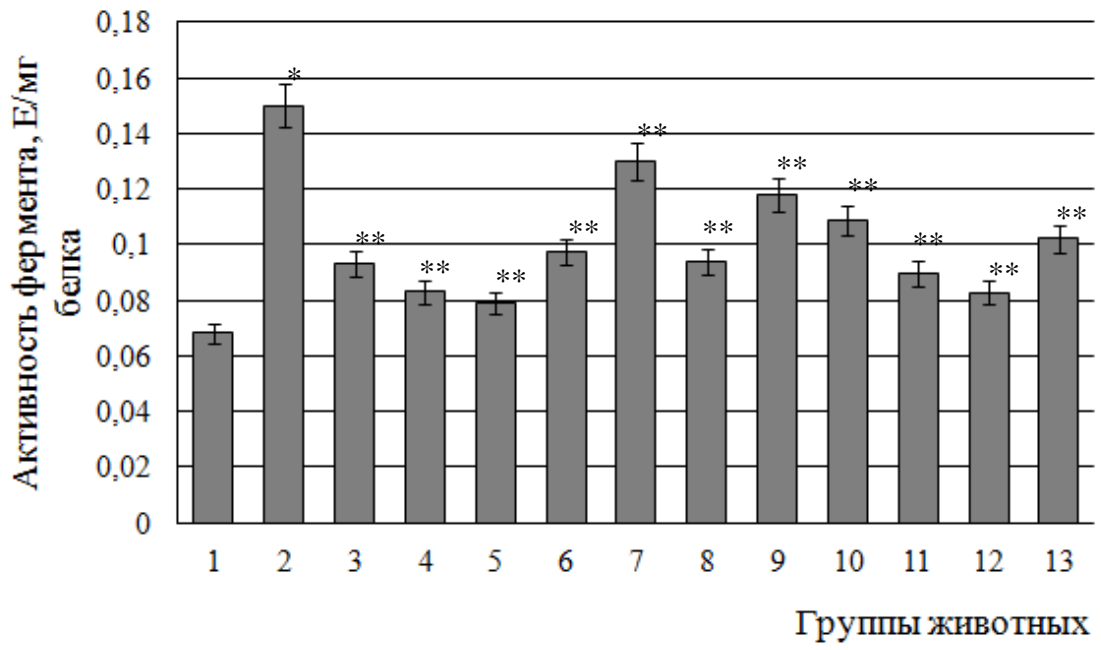


В

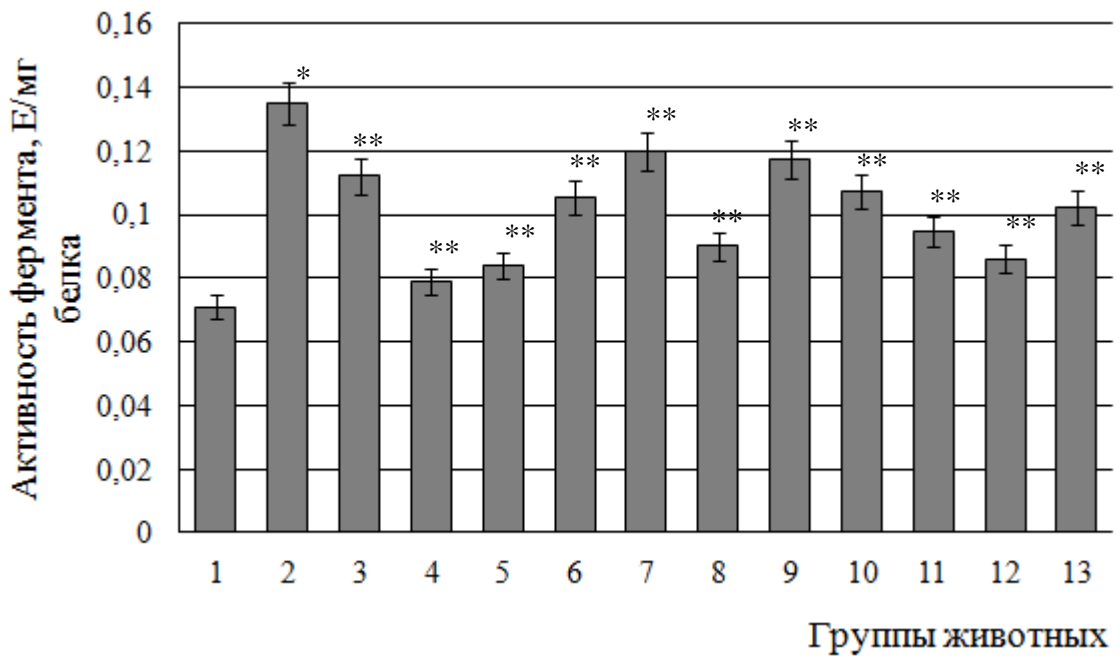


Г

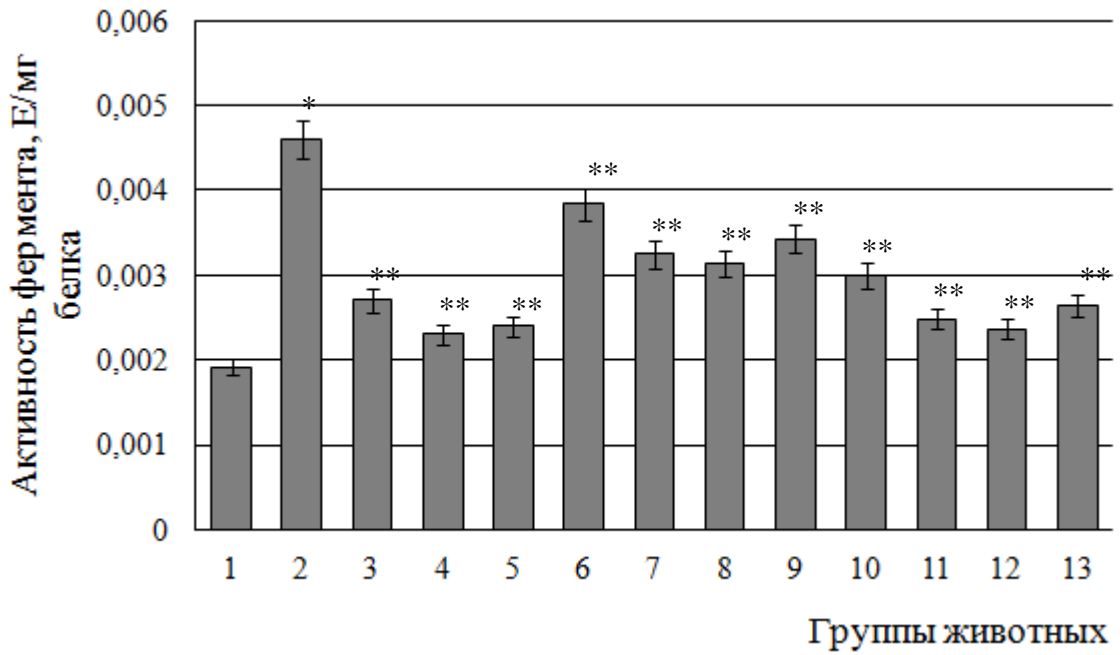
Рис. 14. Активность глутатионредуктазы, выраженная в Е/г сырой массы, в печени (а), почках (б), сердце (г) и в Е/мл в сыворотке крови (в) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)



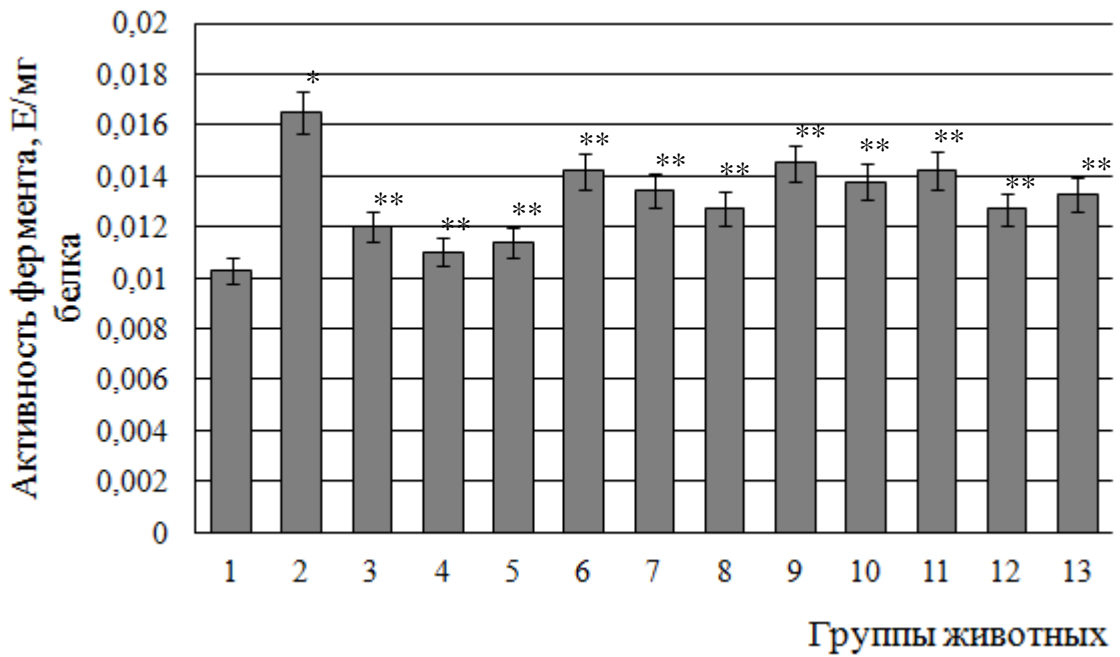
а



б

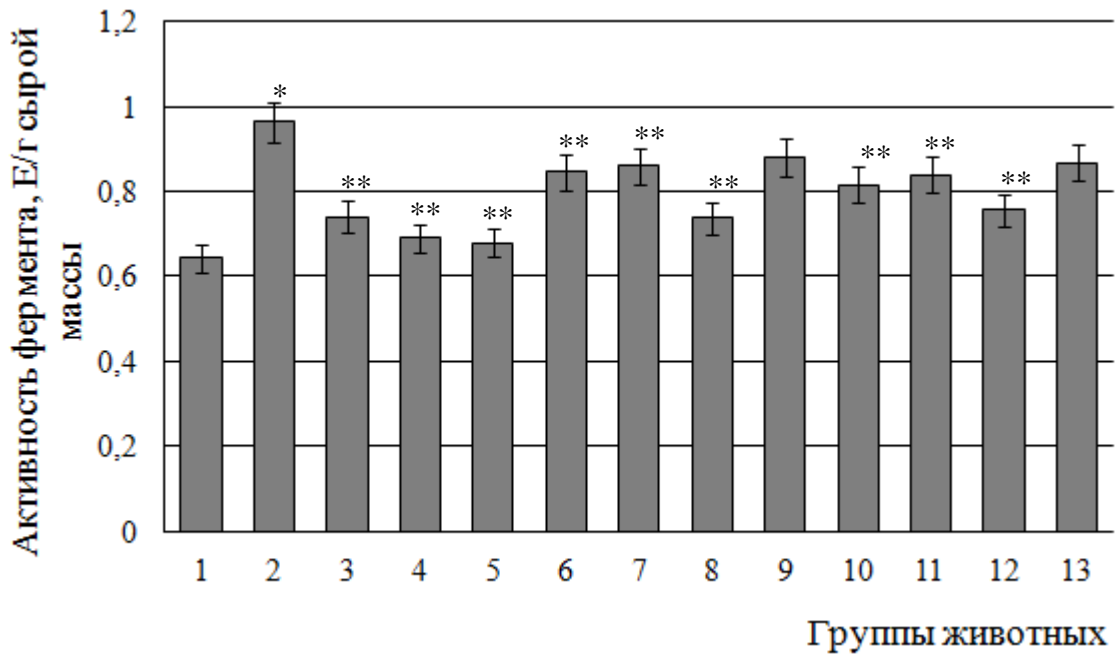


В

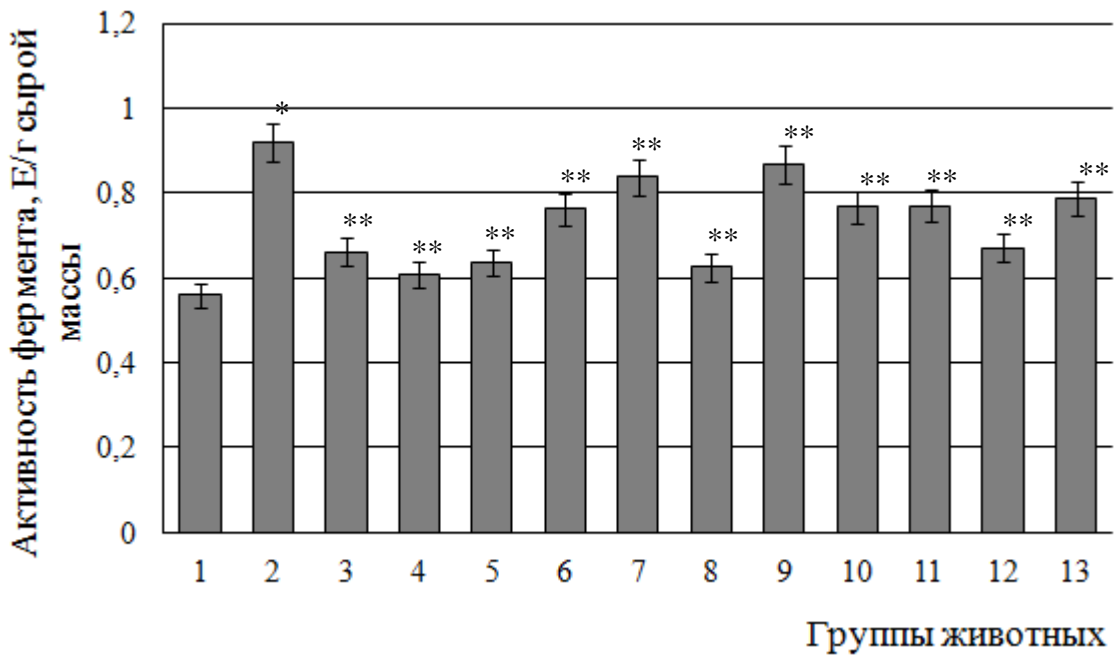


Г

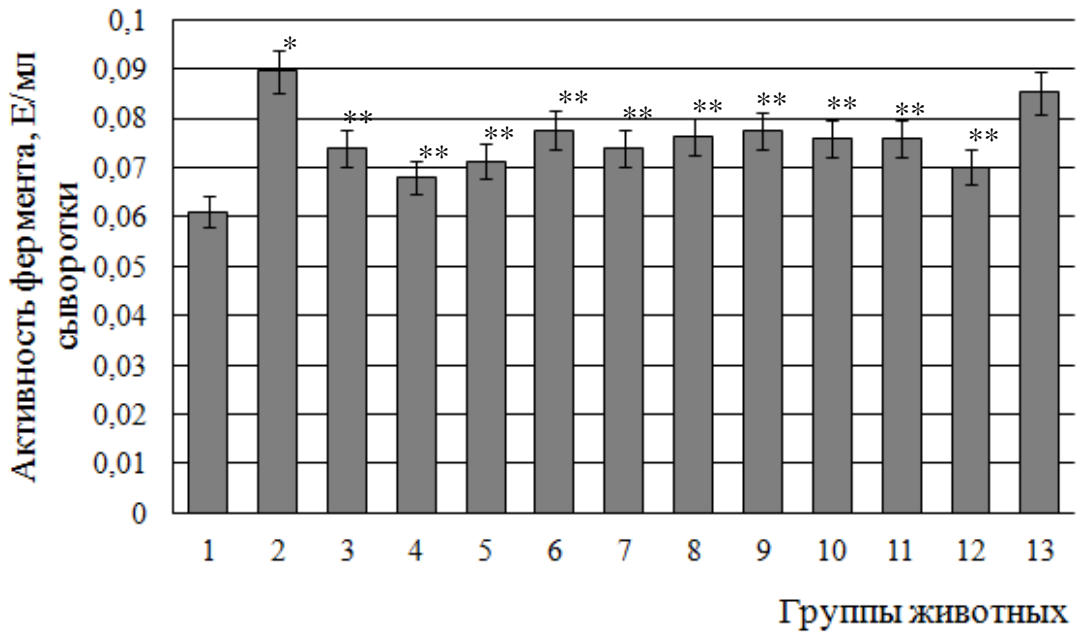
Рис. 15. Активность глутатионредуктазы, выраженная в Е/мг белка, в печени (а), почках (б), сыворотке (в) и сердце (г) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)



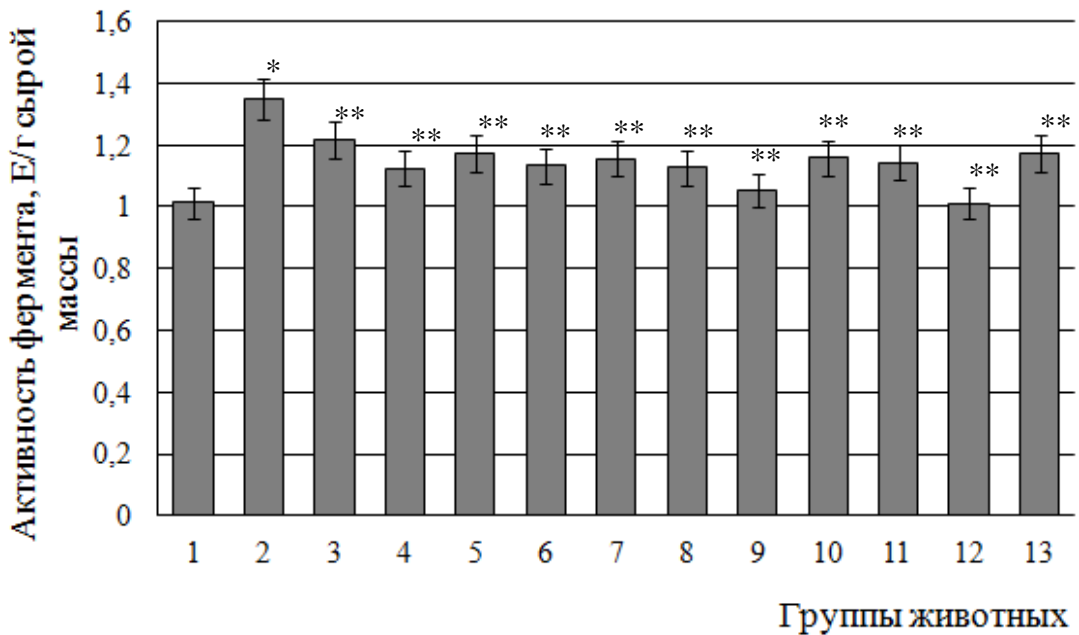
а



б

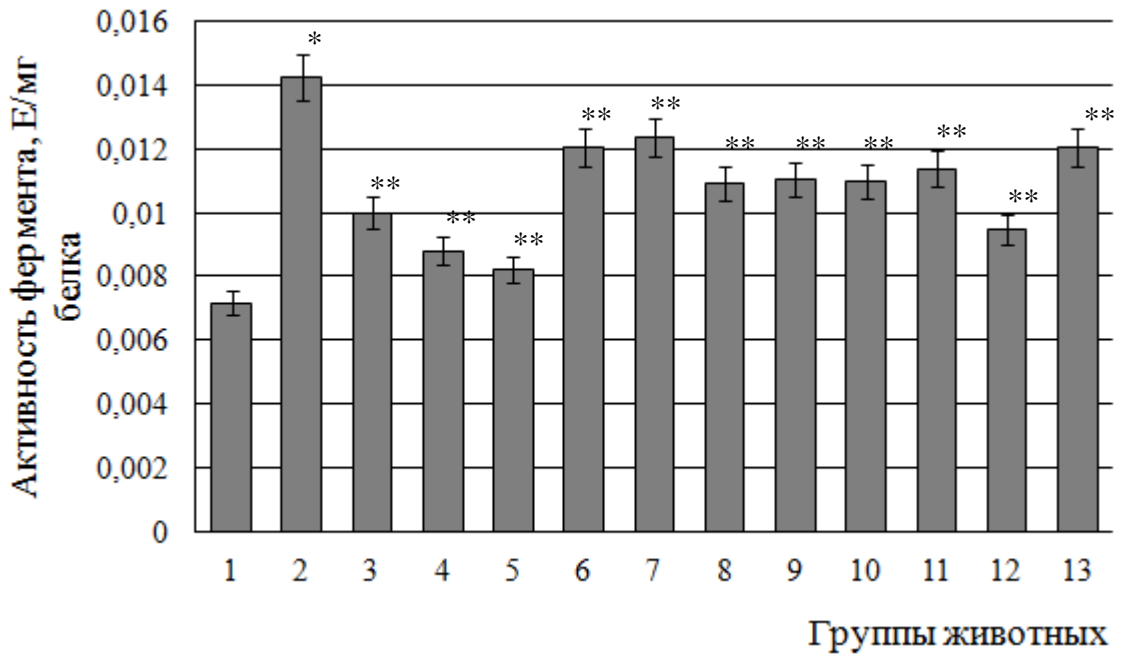


в

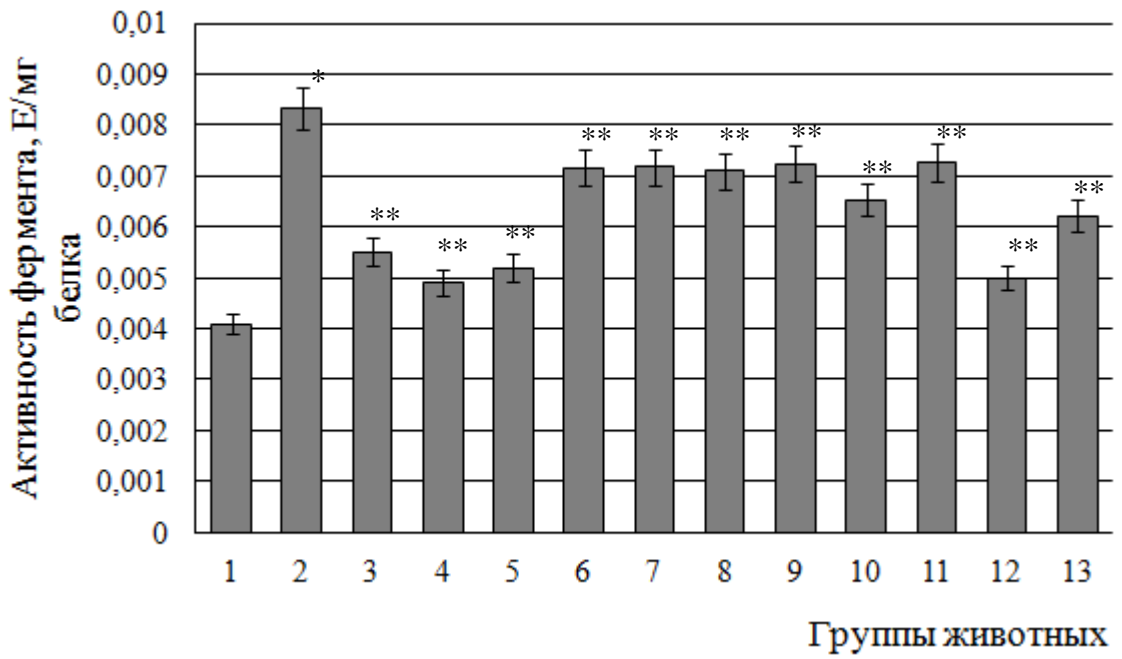


г

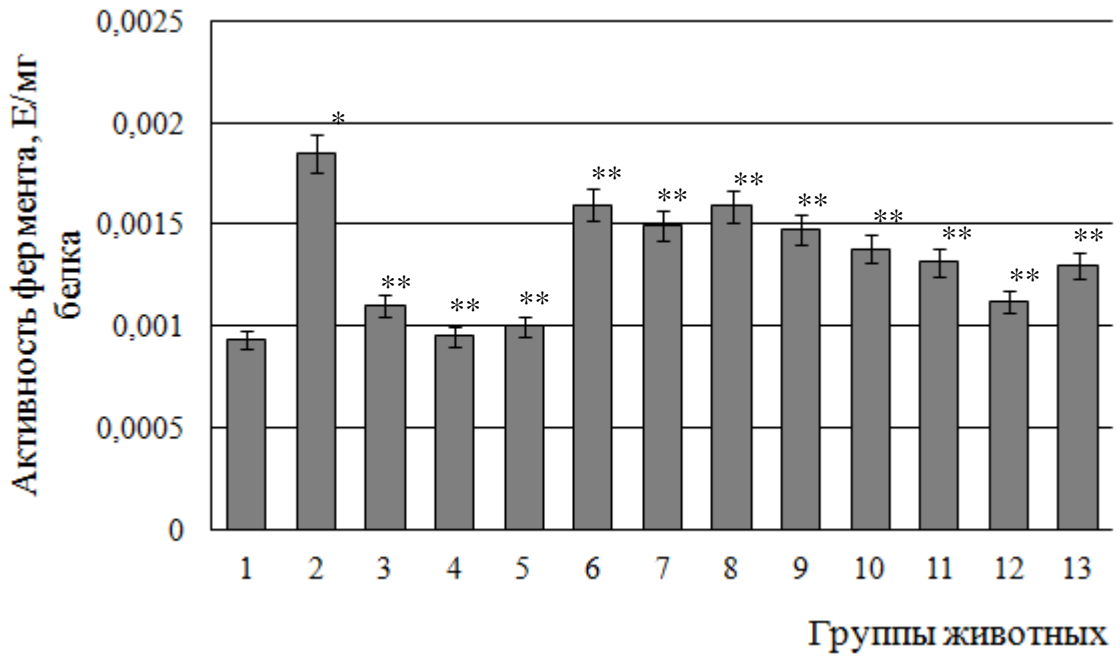
Рис. 16. Активность глутатионтрансферазы, выраженная в Е/г сырой массы, в печени (а), почках (б), сердце (г) и в Е/мл в сыворотке крови (в) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)



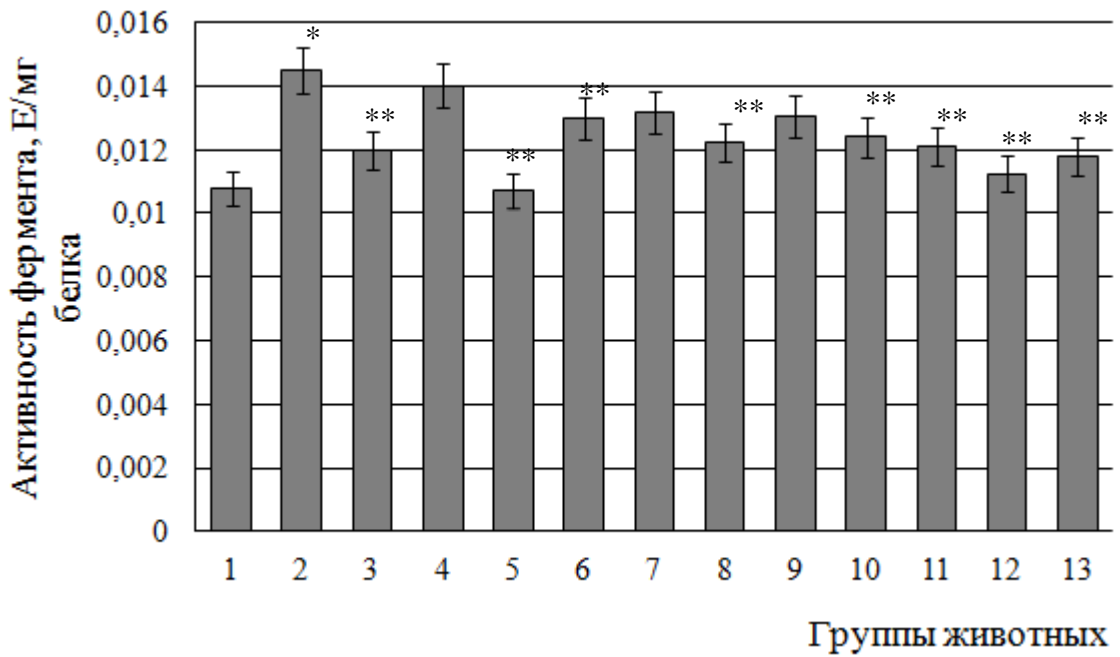
а



б



В



Г

Рис. 17. Активность глутатионтрансферазы, выраженная в Е/мг белка, в печени (а), почках (б), сыворотке (в) и сердце (г) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)

Очевидно, что при развитии ОС, вызванного патологическим состоянием, происходит интенсификация функционирования глутатионовой антиоксидантной системы. Известно, что ГР и ГП могут индуцироваться при ОС [138, 190]. Ген ГП, как и гены СОД и каталазы, имеет в области промотора сайт связывания для редокс-чувствительного транскрипционного ядерного фактора NF-κB (nuclear factor κB) [246], который контролирует экспрессию ряда генов, играющих важную роль в ответе на стресс. Имеются также данные, что транскрипция гена ГР находится в зависимости от степени восстановленности транскрипционного фактора OxyR [38]. Активация данного белка под действием H₂O₂ стимулирует синтез порядка 30 ферментов, в том числе и ГР.

При действии эпифамина в дозе 1,2 мг/кг на фоне СД2 концентрация GSH повышалась в печени и сердце в 1,2 раза, в почках – в 1,1 раз, в сыворотке крови – в 1,4 раза по сравнению с величиной показателя при СД2. При введении эпифамина как в дозе 2,5 мг/кг, так и 5,0 мг/кг концентрация GSH возрастала в печени и сердце в 1,3 раза, в почках в 1,2 раза, в сыворотке в 1,6 раза по сравнению с патологией. При введении мелаксена в дозе 10 мг/кг наблюдалось повышение концентрации GSH в печени в 1,4 раза, в почках – в 1,3, в сыворотке – в 1,7 раза, в сердце в 1,5 раза. Действие мелаксена в дозах 2,5, 5,0 и 20 мг/кг характеризовалось сходным повышением концентрации GSH в печени, почках и сердце (в 1,2 раза). В сыворотке крови экспериментальных животных содержание восстановленной формы данного тиола возрастала на 39% при введении мелаксена в дозе 2,5 мг/кг, на 44% - в дозе 5,0 мг/кг, на 52% – в дозе 20 мг/кг. При использовании вальдоксана в качестве протектора при экспериментальном СД2 наблюдалось возрастание уровня GSH в печени крыс в 1,1 раза при использовании дозы 2,5 и 20 мг/кг, в 1,2 раза – 5,0 мг/кг, в 1,3 раза – 10 мг/кг. Введение данного препарата в дозах 2,5, 5,0 и 10 мг/кг приводило к повышению концентрации глутатиона в почках в 1,2 раза, а в дозе 20 мг/кг – в 1,1 раза. Применение вальдоксана в дозах 2,5, 5, 10 и 20 мг/кг приводило к возрастанию уровня

GSH в сыворотке соответственно в 1,5, 1,4, 1,7 и 1,2 раза, в сердце – в 1,2, 1,1, 1,3 и 1,5 раза (рис. 11).

Наряду с этим при введении крысам с СД2 эпифамина в дозе 1,2 мг/кг было выявлено снижение активности ГП, ГР и ГТ в печени, выраженной в виде Е/г сырой массы, в 1,5, 1,4 и 1,3 раза соответственно; при действии эпифамина в дозе 2,5 и 5,0 мг/кг – в 1,7, 1,5 и 1,4 раза по сравнению с уровнем при патологии. В почках, также, наблюдалось снижение активности ГП при введении эпифамина в дозе 1,2, 2,5 и 5,0 мг/кг в 1,4, 1,5 и 1,6 раза; активность ГР и ГТ снижалась в 1,3 и 1,4 раза при действии доз 1,2 и 5,0 мг/кг и в 1,4 и 1,5 раза – 2,5 мг/кг. В сердце наибольшие изменения активности ГП и ГР были выявлены при действии эпифамина в дозе 5,0 мг/кг – в 1,2 и 1,4 раза. Активности ГТ в одинаковой степени снижалась (в 1,2 раза) при введении эпифамина в дозах 2,5 и 5,0 мг/кг.

Использование мелаксена в качестве протектора при развитии экспериментального СД2 приводило к снижению активности ферментов метаболизма глутатиона в исследуемых тканях. Наблюдаемый эффект имел дозозависимый характер при этом наиболее выраженные изменения были характерны для группы животных, которым вводили указанный препарат в дозе 10 мг/кг. При этом активность ГП, ГР и ГТ, выраженная в виде Е/г сырой массы, снижалась в печени в 1,9, 1,7 и 1,3 раза, в почках в 2,2, 1,4 и 1,5 раза. В сердце активность ГП снижалась в 1,3, а ГР и ГТ – в 1,2 раза. Активность указанных ферментов, выраженная в Е/мл, в сыворотке крови снижалась в 2,4, 1,4 и 1,2 раза (рис. 12, 14, 16).

Кроме того, при введении вальдоксана крысам с СД2 было выявлено снижение активности ГП, ГР и ГТ, выраженной в виде Е/г сырой массы, при этом наиболее значительные изменения были выявлены при использовании дозы 10 мг/кг. Так, в печени активность ферментов была ниже в 2,0, 1,5 и 1,3 раза, в сердце в 1,3 раза по сравнению с уровнем при СД2. В почках активность ГП снижалась в 1,6 раза, активность ГР и ГТ в 1,4 раза.

Активность указанных ферментов, выраженная в Е/мл, в сыворотке крови снижалась в 1,5, 1,6 и 1,3 раза (рис. 12, 14, 16).

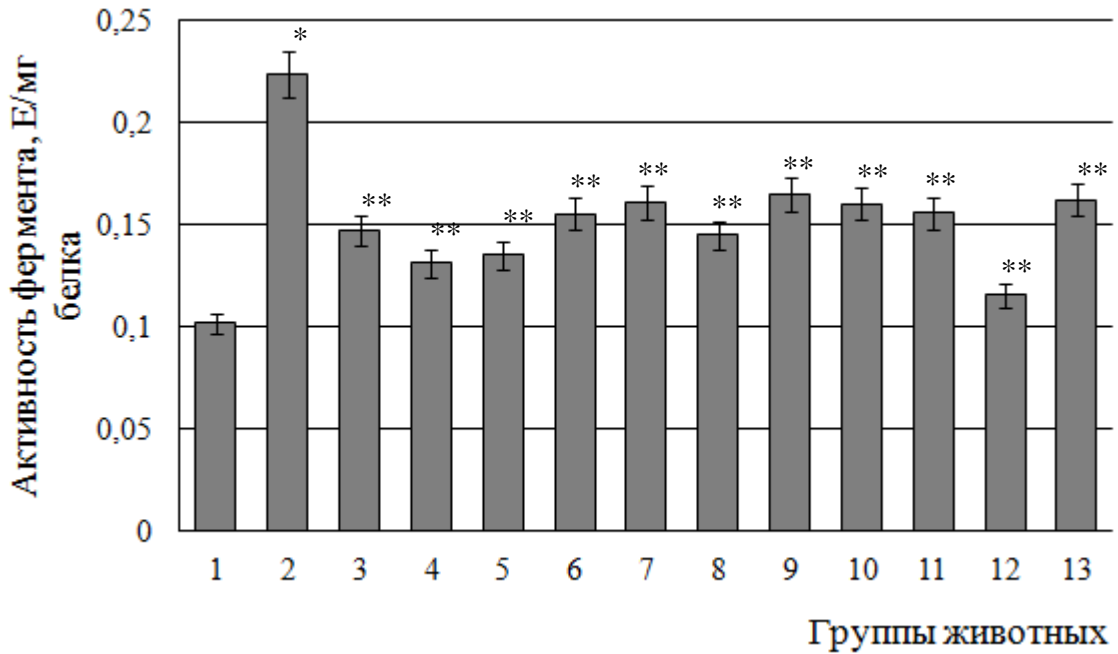
Изменения удельной активности ферментов в печени, сердце и сыворотке крови крыс имели тот же характер (рис. 13, 15, 17). Очевидно, введение исследуемых веществ сопровождалось снижением интенсивности СРП в организме животных и соответствующим снижением степени мобилизации данных ферментов антиоксидантной защиты, сопряженным с уменьшением расхода восстановленного глутатиона. Кроме того, существуют литературные данные, что мелатонин способен активировать синтез глутатиона путем индукции гамма-глутамилцистеинсинтетазы [173].

3.3.3. Активность некоторых НАДФ-зависимых ферментов в тканях экспериментальных животных при сахарном диабете 2 типа и действии исследуемых веществ-протекторов

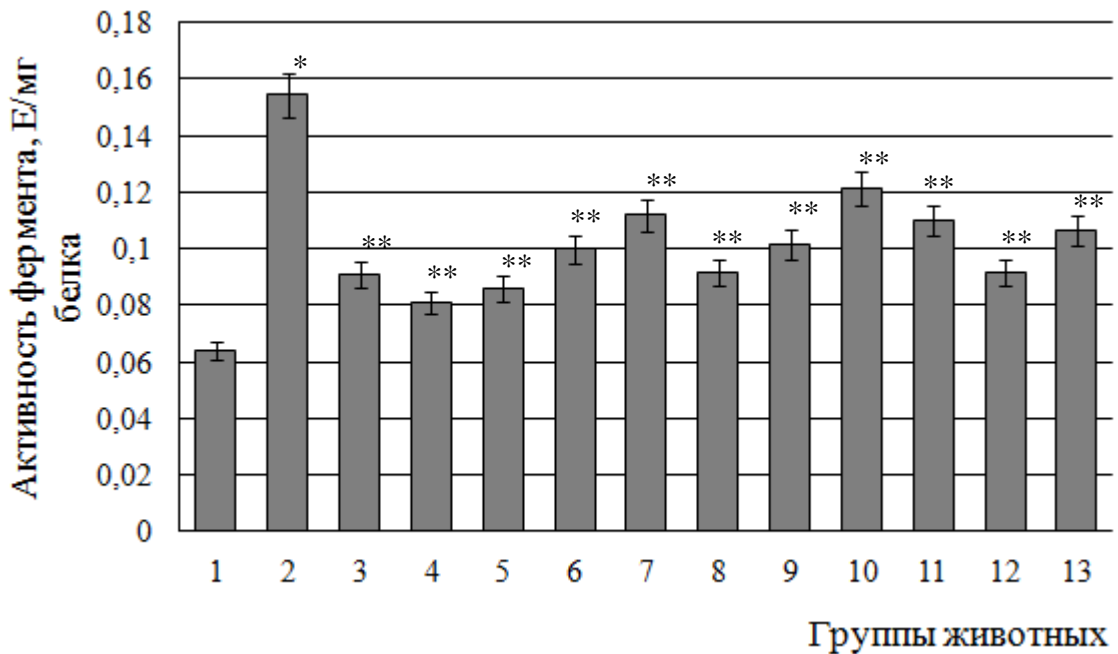
Нормальное функционирование глутатионовой АОС сопряжено с постоянным поступлением в систему восстановительных эквивалентов. В этой связи представляет интерес анализ активности ферментов, участвующих в поддержании определенного уровня НАДФН в условиях интенсификация работы данной АОС. Известно, что пентозофосфатный путь является одним из ключевых поставщиков восстановительных эквивалентов для работы ГП/ГР АОС. Кроме того, дополнительным источником НАДФН может быть реакция окислительного декарбоксилирования изоцитрата до 2-оксоглутарата, катализируемая НАДФ-ИДГ [21].

В этой связи была произведена оценка изменений активностей Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ в контрольных условиях, при СД2 и введении мелатонин-корректирующих препаратов в различных дозах. Результаты исследований показали, что при СД2 наблюдается возрастание удельной активности НАДФ-ИДГ в печени крыс в 2,2 раза, в почках – в 2,4 раза, в сыворотке крови – в 1,6 раза и в сердце – в 1,9 раза по сравнению с контролем (рис. 18).

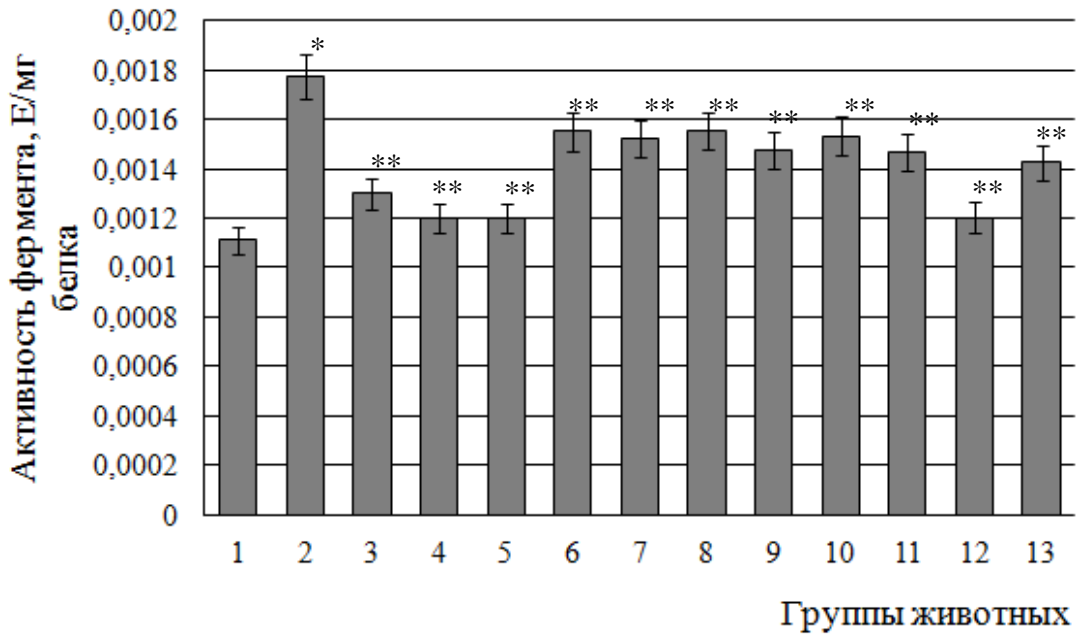
Очевидно, изменение активности данного фермента носит адаптивно-компенсаторный характер в ответ на интенсификацию метаболизма восстановительных эквивалентов через ГП/ГР АОС при развитии ОС на фоне патологического процесса.



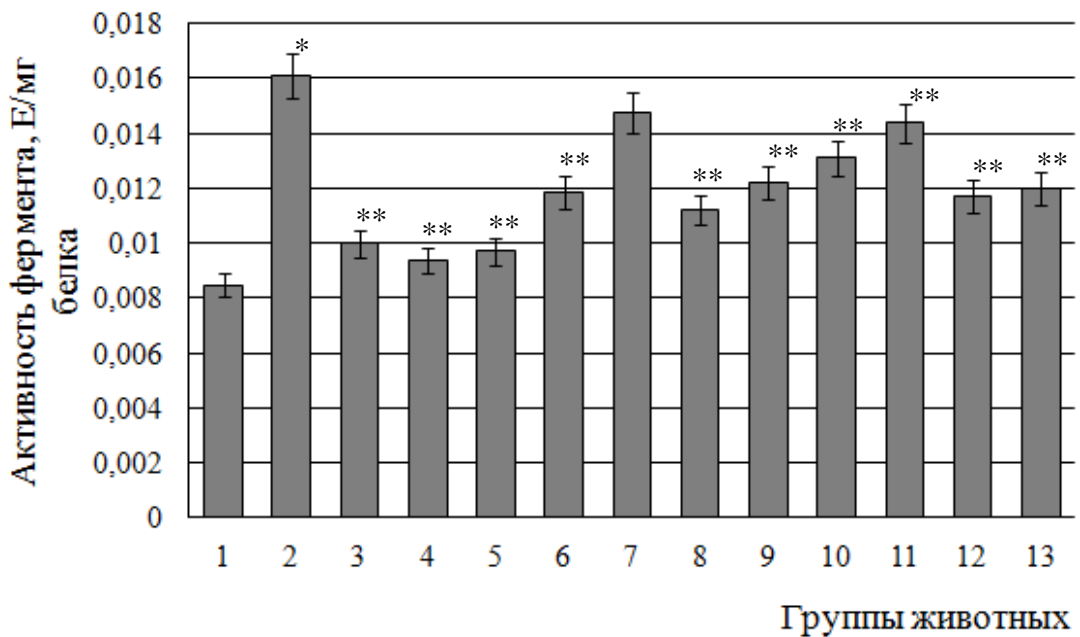
а



б

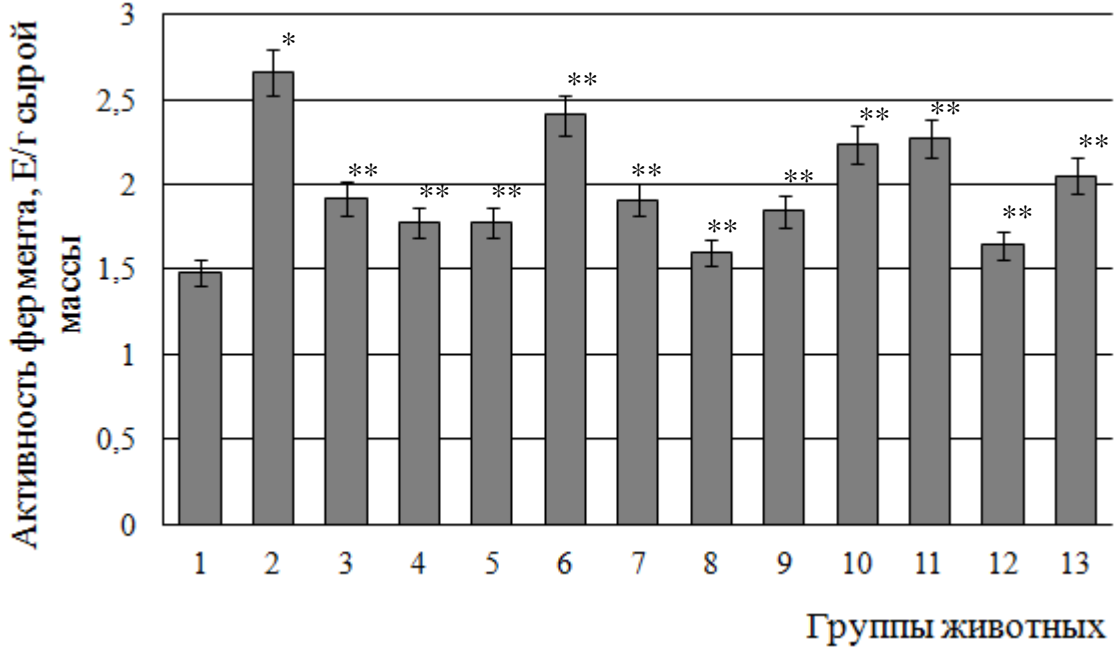


В

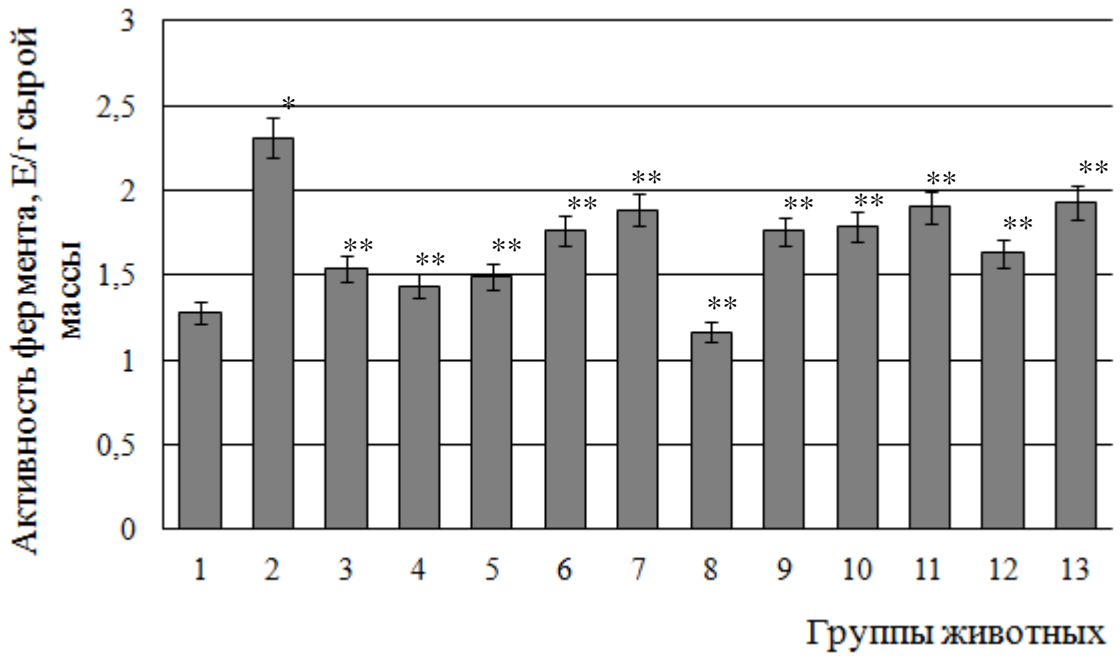


Г

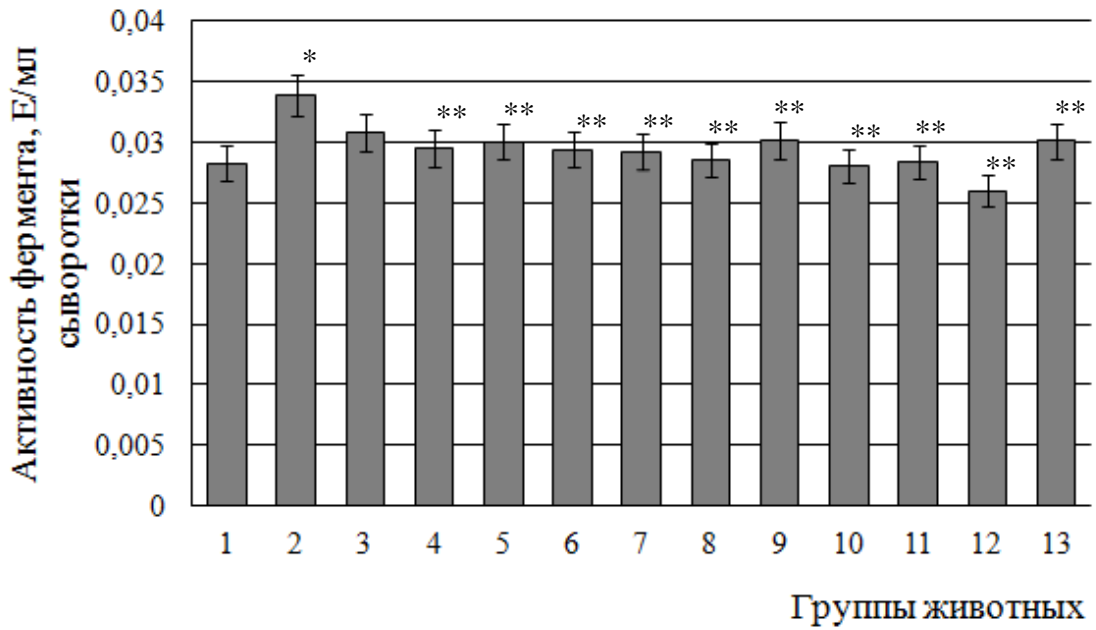
Рис. 18. Активность НАДФ-изоцитратдегидрогеназы, выраженная в Е/мг белка, в печени (а), почках (б), сыворотке (в) и сердце (г) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)



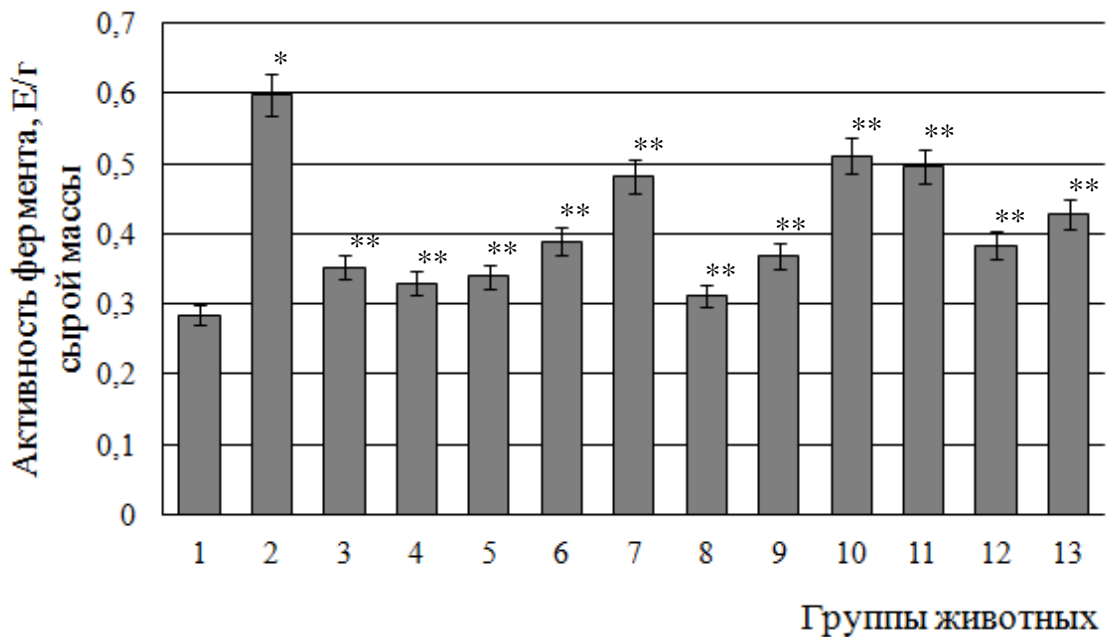
а



б



в

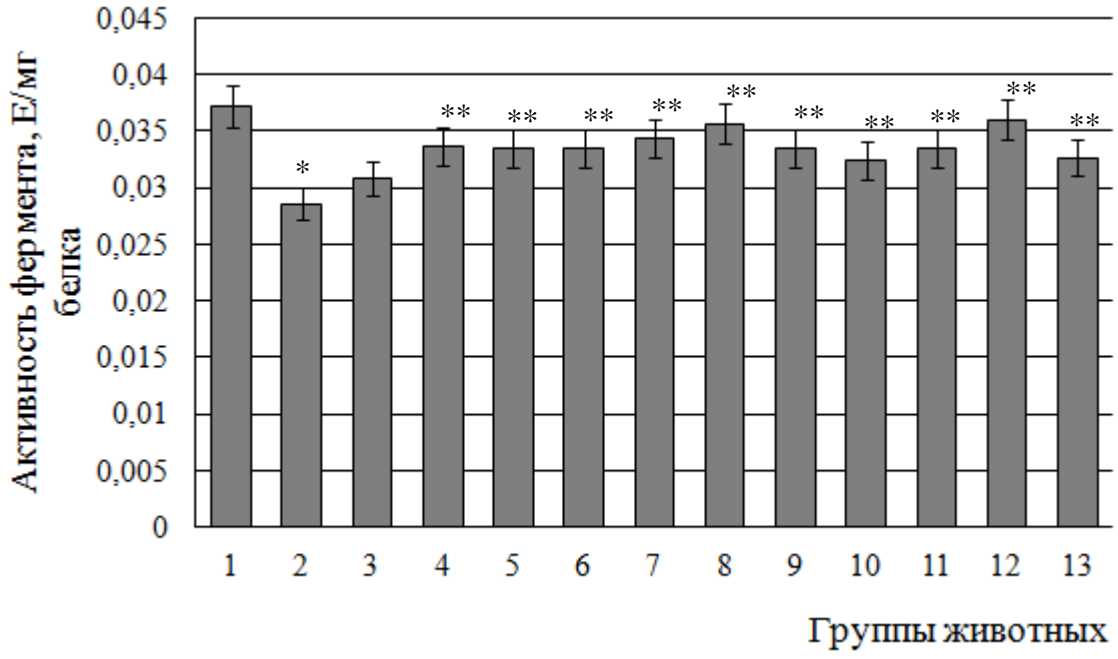


г

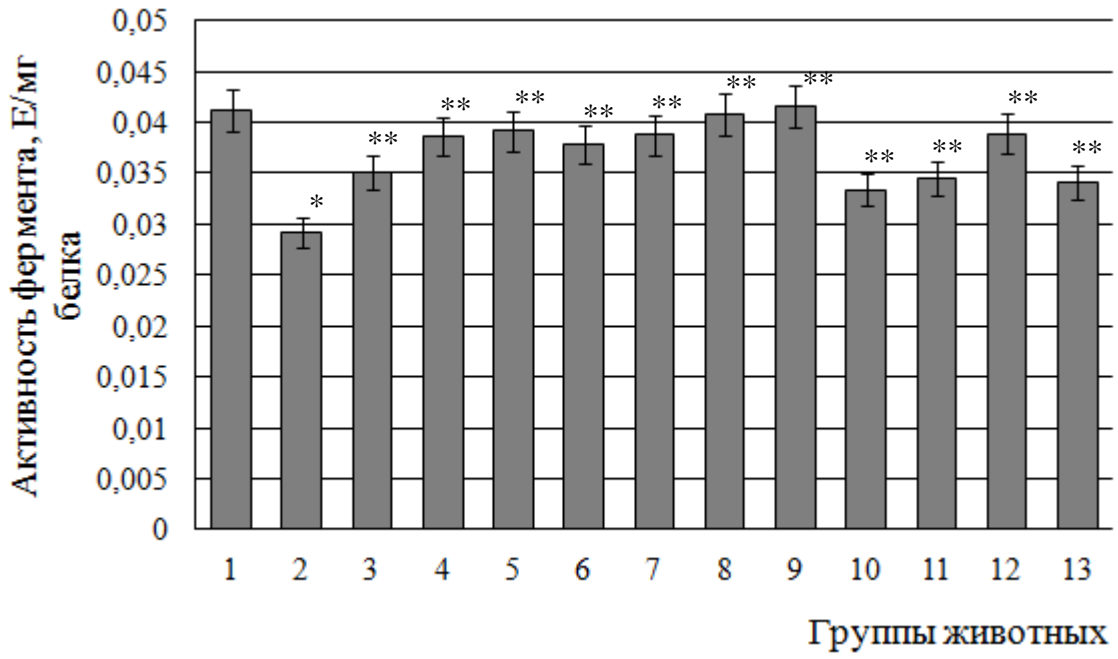
Рис. 19. Активность НАДФ-изоцитратдегидрогеназы, выраженная в Е/г сырой массы, в печени (а), почках (б), сердце (г) и в Е/мл в сыворотке крови (в) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)

При введении веществ-протекторов животным с СД2 отмечалось снижение активности НАДФ-ИДГ по сравнению с величиной показателя при СД2. Так, удельная активность НАДФ-ИДГ при действии эпифамина в дозе 1,2 мг/кг снижалась в печени на 52%, в почках на 70%, в сыворотке крови крыс на 37%, в сердце на 61%. При действии эпифамина в дозе 2,5 и 5,0 мг/кг активность фермента уменьшалась в печени и сердце в 1,7 раза и в сыворотке крови в 1,5 раза. В почках активность НАДФ-ИДГ была ниже уровня показателя при патологии в 1,9 раза при действии эпифамина в дозе 2,5 мг/кг и в 1,8 раза – в дозе 5,0 мг/кг. Подобные изменения удельной активности НАДФ-ИДГ были выявлены и при введении мелаксена и вальдоксана животным с патологией. Так, воздействие данных мелатонин-корректирующих препаратов в дозе 10 мг/кг, в которой проявлялась максимальная эффективность, приводило к уменьшению удельной активности НАДФ-ИДГ в печени в 1,5 и 1,9 раза, в почках в 1,7 раза, в сыворотке в 1,1 и 1,5 раза и в сердце в 1,4 раза соответственно (рис. 18). Вероятно, введение эпифамина, мелаксена и вальдоксана приводило к торможению процессов СО, что сопровождалось снижением степени мобилизации ГР/ГП АОС и подтверждается приведенными ранее результатами определения активности данных ферментов.

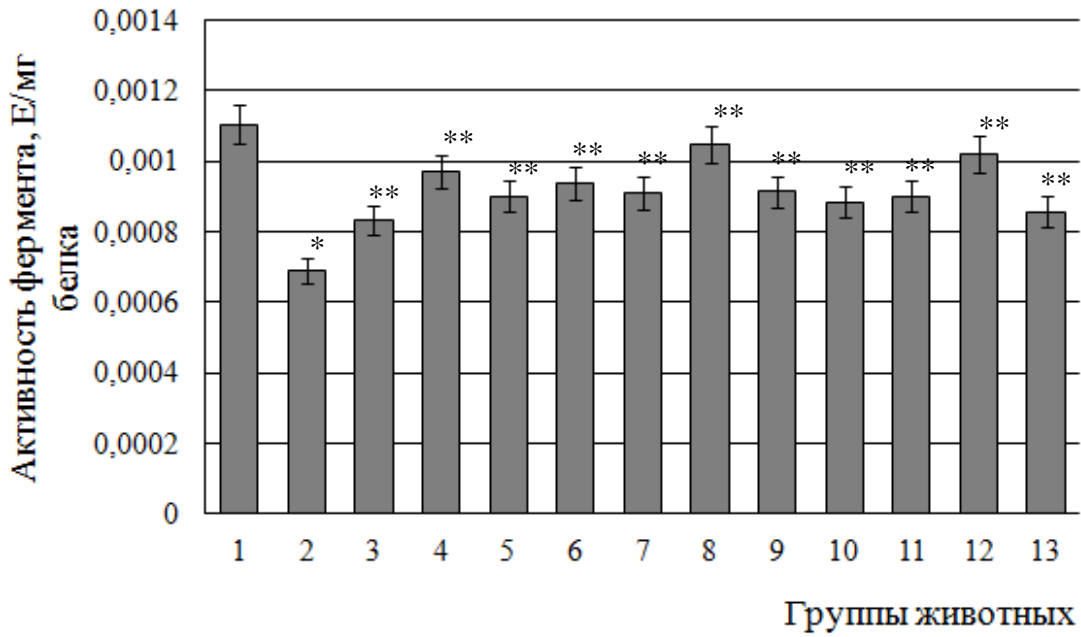
Установлено, что удельная активность Г6ФДГ в печени крыс с СД2 снижалась на 30%, в почках – на 41%, в сыворотке крови – на 60%, в сердце – на 37% относительно контрольных значений (рис. 20).



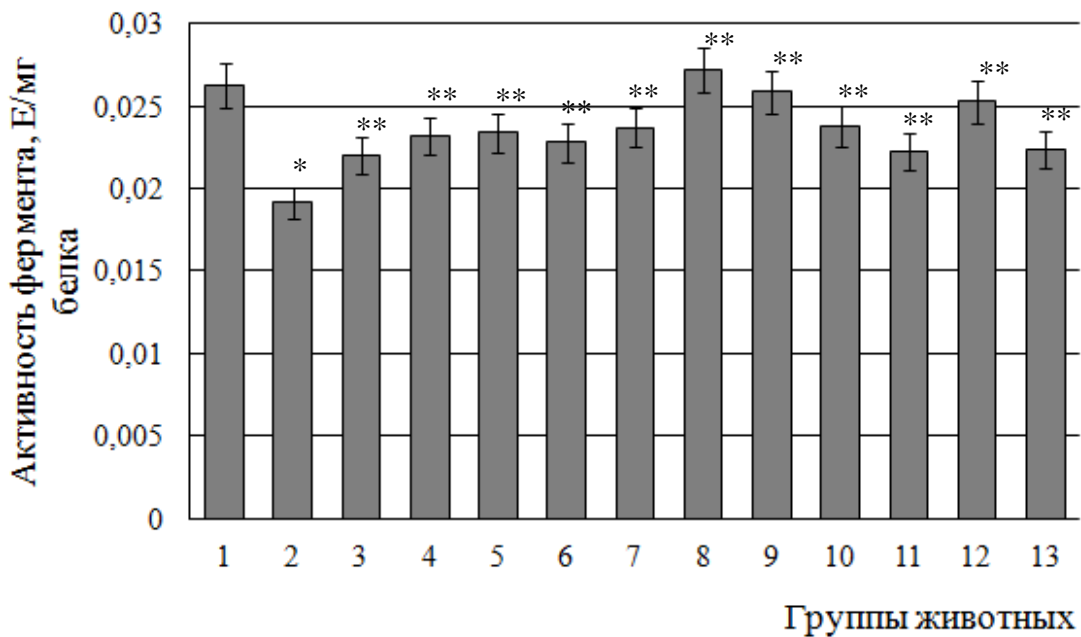
а



б

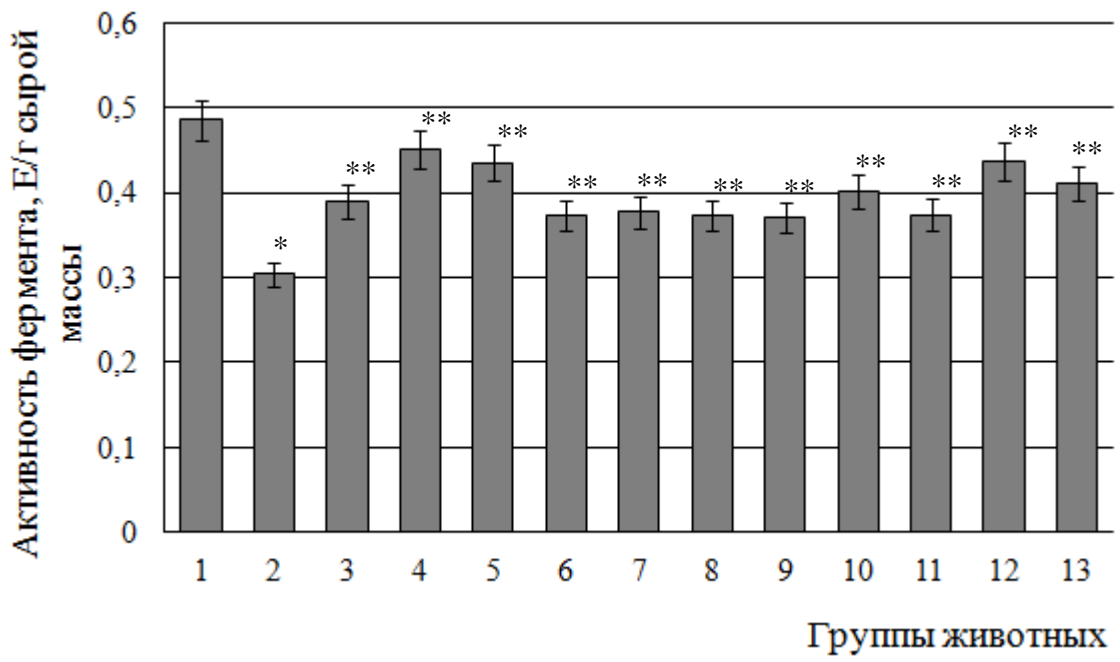


В

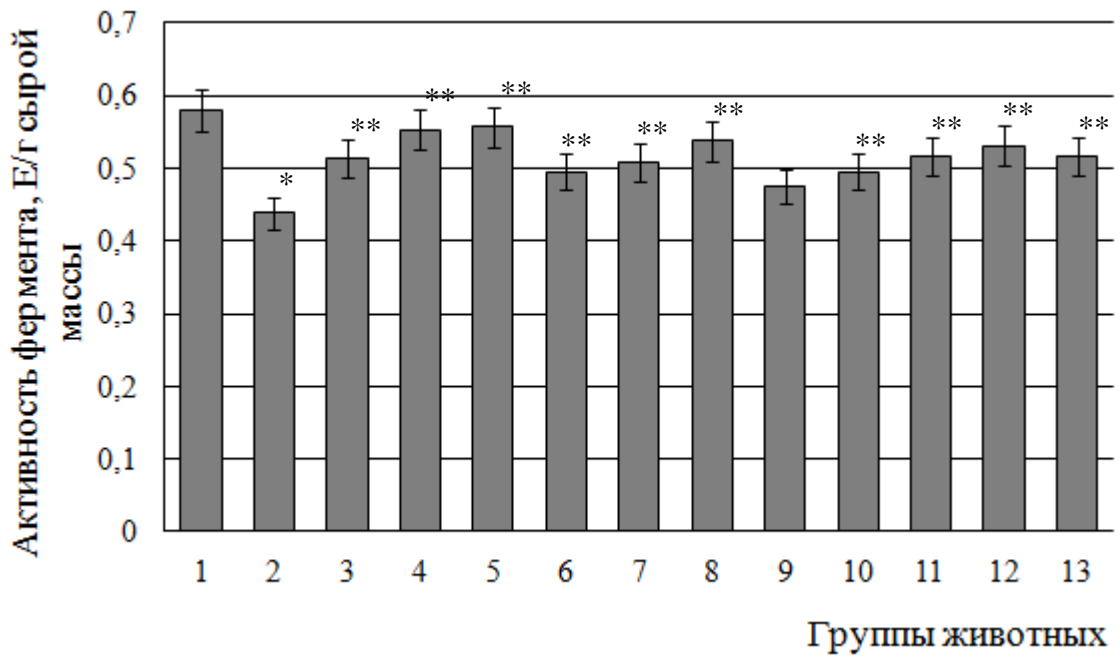


Г

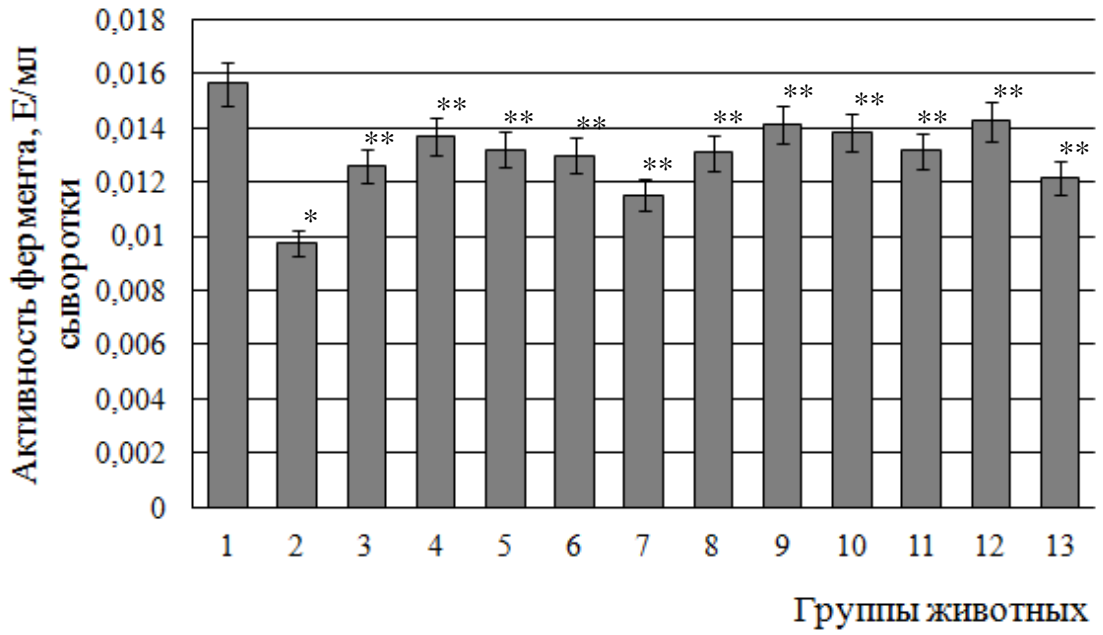
Рис. 20. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, выраженная в Е/мг белка, в печени (а), почках (б), сыворотке (в) и сердце (г) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)



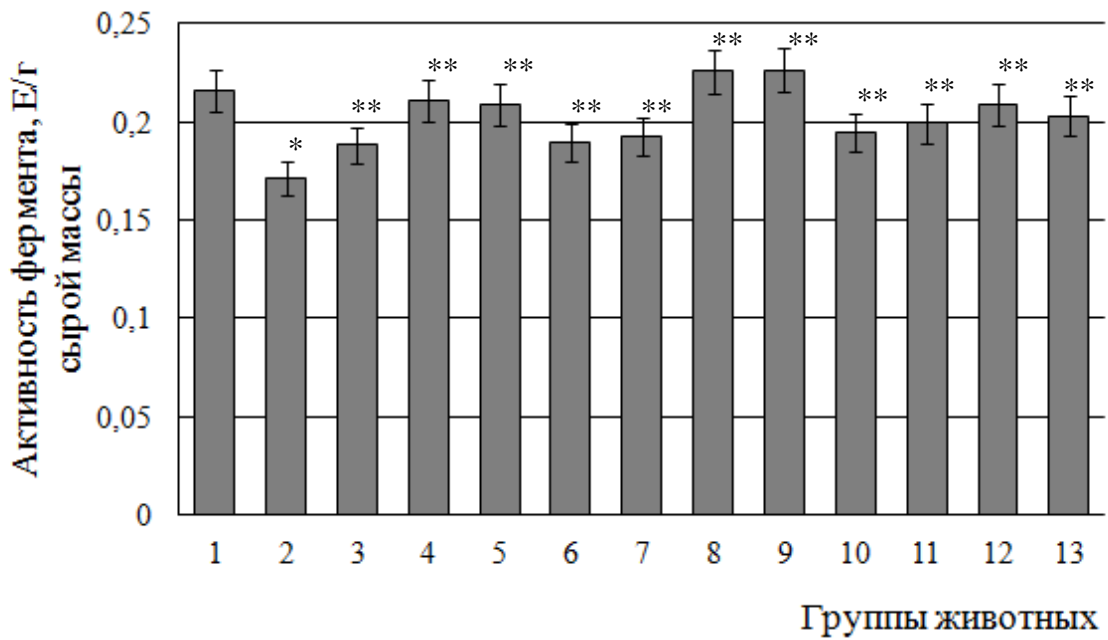
а



б



в



г

Рис. 21. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, выраженная в Е/г сырой массы, в печени (а), почках (б), сердце (г) и в Е/мл в сыворотке крови (в) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (3), 2,5 мг/кг (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 мг/кг (6), 5,0 мг/кг (7), 10 мг/кг (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг (10), 5,0 мг/кг (11), 10 мг/кг (12) и 20 мг/кг (13)

Известно, что при СД снижена интенсивность функционирования пентозофосфатного пути [71]. Причинами снижения, как предполагают, являются подавление синтеза глюкокиназы и индукция глюкозо-6-фосфатазы в печени, вследствие чего уменьшается доступность глюкозо-6-фосфата для Г6ФДГ [39]. Возрастание скорости глюконеогенеза при данной патологии [9] также может быть сопряжено с торможением пентозофосфатного пути, что связано с перераспределением глюкозо-6-фосфата между различными путями метаболизма углеводов. Кроме того, обе дегидрогеназы пентозофосфатного пути индуцируются инсулином и кортикостероидами, таким образом, в условиях инсулинорезистентности, характерной для СД2, экспрессия Г6ФДГ, по-видимому, должна быть снижена. Также при гексоаминовом механизме метаболизации глюкозы в условиях гипергликемии глутамин-фруктозо-6-фосфатамидотрансфераза катализирует превращение глюкозо-6-фосфата в глюкозамин-6-фосфат и затем в уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамин. Этот конечный продукт метаболизма вызывает нарушения транскрипции, приводя к изменению структуры белковых рецепторов к инсулину, вследствие чего развивается резистентность к нему [213].

При введении эпифамина в дозе 1,2 мг/кг крысам с СД2 наблюдалось повышение удельной активности Г6ФДГ в печени в 1,1 раза, в почках, сыворотке и сердце в 1,2 раза по сравнению со значениями при патологии. При действии эпифамина в дозе 2,5 и 5,0 мг/кг активность Г6ФДГ возрастала в печени и сердце в 1,2 раза, почках в 1,3 раза, в сыворотке крови крыс в 1,4 и 1,3 раза. Введение мелаксена животным с патологией оказывало сходный эффект по отношению к удельной активности Г6ФДГ в исследуемых тканях. Так, в печени активность фермента возрастала во всех исследуемых дозах в 1,2 раза, в почках в 1,3 и 1,4 раза при использовании доз 2,5, 5,0 и 10, 20 мг/кг соответственно. Наряду с этим, отмечено увеличение активности Г6ФДГ в сыворотке крови при введении мелаксена в дозе 5,0 и 20 мг/кг в 1,3 раза, в дозе 2,5 мг/кг в 1,4 раза, в дозе 10 мг/кг в 1,5 раза. В сердце данный параметр

возрастал в 1,2 раза (2,5 и 5,0 мг/кг), в 1,4 раза (10 мг/кг) и в 1,3 раза (20 мг/кг). Использование вальдоксана в качестве протектора при экспериментальном СД2 также приводило к изменению активности Г6ФДГ в сторону контрольных значений. Наиболее эффективной оказалась доза 10 мг/кг. Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым введение мелатонина в дозе 10 мг/кг крысам с СД1 частично восстанавливало активность ферментов пентозофосфатного пути [15]. Кроме того, известно, что при введении мелатонина крысам с СД, индуцированным стрептозоцином, наряду с активностью Г6ФДГ увеличивается и активность транскетолазы [168].

Таким образом, на основании полученных результатов по исследованию активности НАДФН-генерирующих ферментов, можно сделать заключение, что основной вклад в поставку НАДФН для ГР/ГП антиоксидантной системы при СД2 вносит НАДФ-ИДГ. Это может быть связано со специфическим для данной патологии снижением активности Г6ФДГ. В то же время увеличение последнего параметра под действием использованных протекторов может оказывать существенное положительное влияние на контроль за протеканием процессов СО при патологии, так как полностью обеспечивает возрастание поставки НАДФН для работы глутатионовой АОС. Таким образом, полученные данные указывают на способность эпифамина, мелаксена и вальдоксана оказывать позитивное регулирующее воздействие на метаболические процессы в тканях млекопитающих в условиях развития эндокринопатии, сопровождающейся ОС.

3.3.4. Анализ уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов в тканях крыс с сахарным диабетом 2 типа на фоне введения мелатонин-корректирующих препаратов

Для определения уровня экспрессии генов антиоксидантных ферментов было проведено выделение тотальной РНК из образцов тканей экспериментальных животных. Качество выделенной РНК определяли путем электрофореза образцов в 1% агарозном геле (рис. 22).

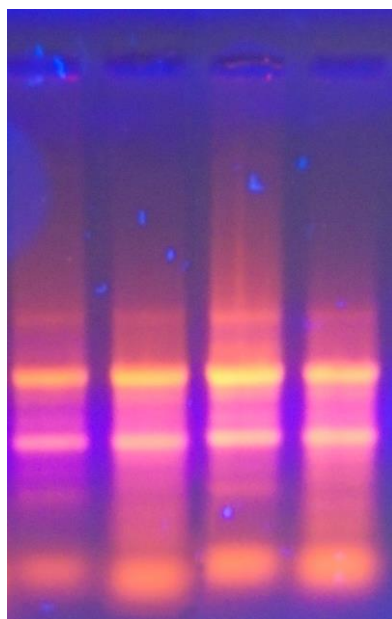


Рис. 22. Электрофореграмма тотальной РНК из тканей животных

При анализе электрофореграммы было выявлено наличие двух ярких полос, соответствующих 28S- и 18S-рибосомальной РНК, что свидетельствует об отсутствии деградации образцов в процессе выделения. Качество РНК оставалось постоянным во всех группах в пределах одного органа и незначительно различалось для различных органов.

Концентрацию и чистоту полученных образцов РНК определяли спектрофотометрически. Образец считали чистым и пригодным для дальнейших манипуляций, когда соотношение оптических плотностей при 260 и 280 было около 2,0, а соотношение при 260 и 230 было в диапазоне 2,0-

2,2. В случае получения существенно низких результатов, проводили повторное выделение РНК.

Синтез кДНК проводили с использованием $oligo(dT)_{15}$ праймера и фермента M-MuLV – генетически модифицированной обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей. В результате была получена библиотека кДНК, экспрессирующихся генов.

Все реакции амплификации подчинялись стандартной кинетике, при которой на кривой накопления ампликонов четко визуализируются три фазы: начальная, логарифмическая и фаза насыщения (рис. 23).

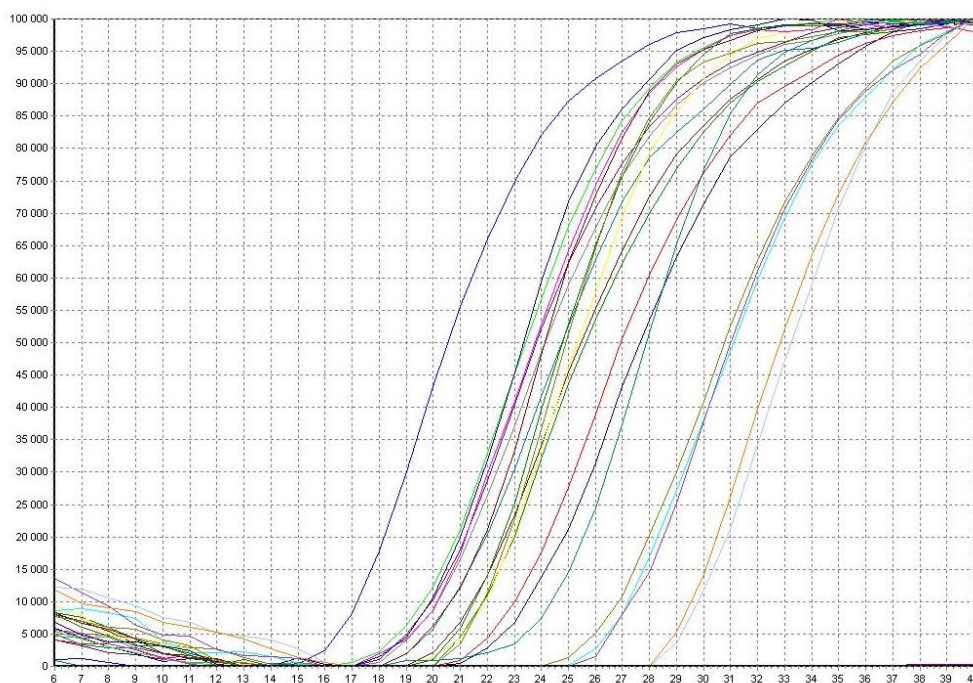


Рис. 23. Кинетическая кривая изменения флуоресцентного сигнала, при накоплении продуктов амплификации, при проведении ПЦР в режиме реального времени

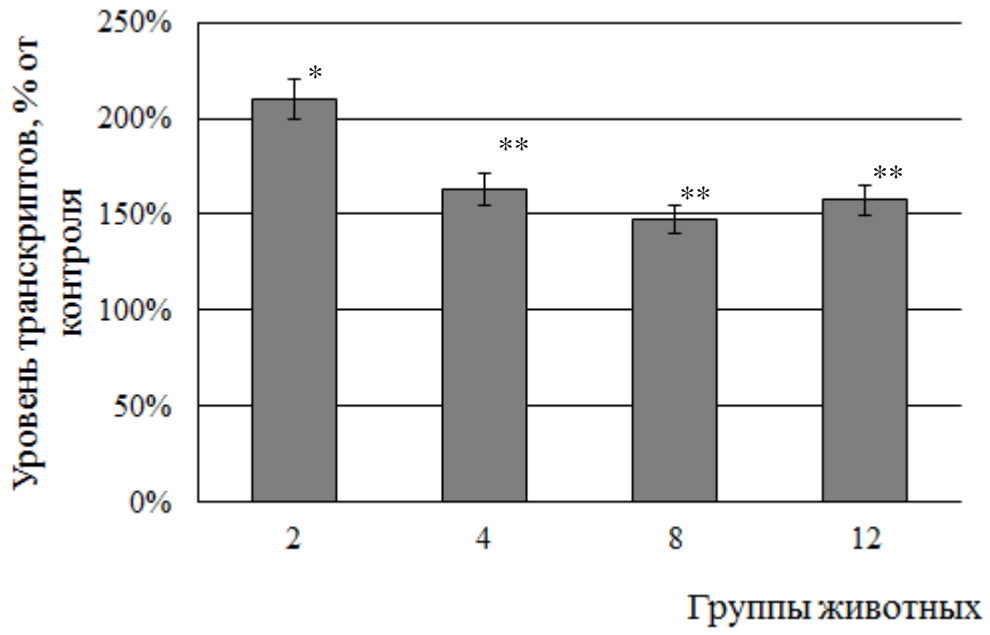
Анализ экспрессии был проведен для генов *Sod1*, *Cat*, *Gpx1* и *Gsr*. Результаты были нормированы относительно контрольного гена *GAPDH*.

В ходе эксперимента было установлено, что при развитии экспериментального СД2 уровень транскриптов СОД и каталазы возрастал в

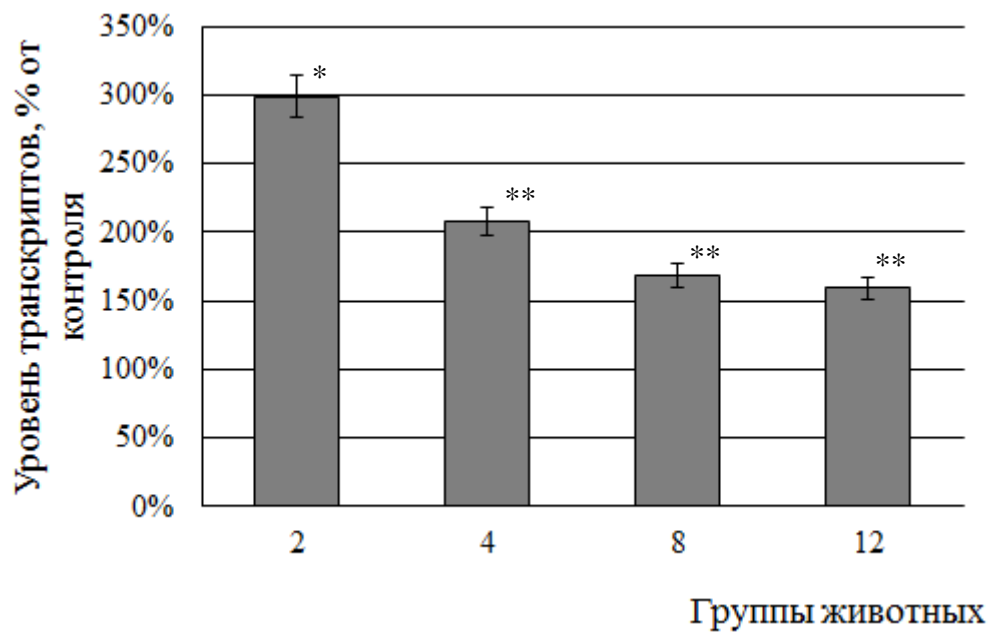
печени в 2,1 и 2,4 раза, в почках в 3,0 и 2,1 раза, в сыворотке в 1,8 раза, в сердце в 3,7 и 2,4 раза (рис. 24, 25). При этом, наблюдалось увеличение экспрессии гена *Gpx1* в печени и почках в 2,8 раза и *Gsr* – в 2,1 раза по сравнению с группой контрольных животных. В крови наблюдалось увеличение уровня транскриптов данных генов в 2,0 раза, в сердце – в 2,1 и 2,8 раза соответственно (рис. 26, 27). Обнаруженные изменения в уровне транскриптов генов антиоксидантных ферментов, вероятно, являются адаптивной реакцией организма на увеличение генерации АФК при развитии патологии. Известно также, что циркулирующий в плазме селенопротеин Р, содержание которого возрастает при СД2 [232], стимулирует экспрессию и увеличивает активность ГП [230].

Введение мелатонин-корректирующих препаратов животным с СД2 способствовало снижению уровня экспрессии генов антиоксидантных ферментов. При этом наибольший эффект был отмечен при использовании мелаксена в дозе 10 мг/кг. Так, относительный уровень транскрипции генов *Sod1* и *Cat* снижался в печени в 1,4 и 1,9 раза, в почках в 1,8 и 1,3 раза, в сыворотке в 1,5 и 1,6 раза, в сердце в 2,0 и 1,3 раза. При этом, экспрессия генов *Gpx1* и *Gsr* уменьшалась в 2,1 и 1,6 раза в печени, в 1,5 и 1,6 раза в почках, в 1,4 раза в сыворотке и в 1,5 и 2,4 раза в сердце относительно уровня при СД2.

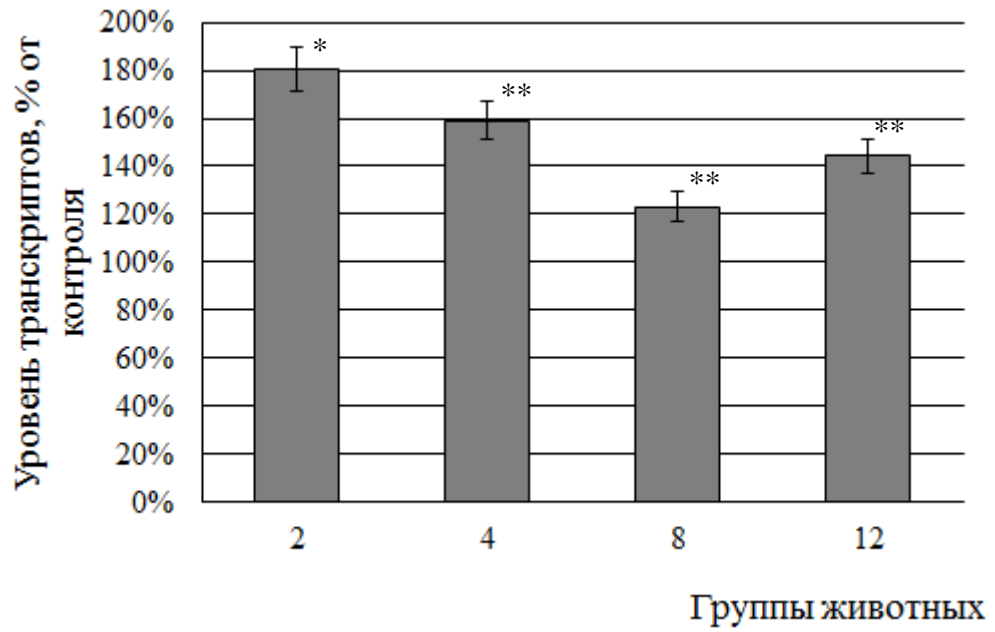
Снижение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов при введении мелатонин-корректирующих препаратов на фоне развития СД2 и РА, вероятно, происходит благодаря антиоксидантному действию этих препаратов, снижающих мобилизацию ферментов АОС. Таким образом, степень развития ОС, очевидно, отражается на уровне экспрессии ферментов АОС. При этом наиболее выраженное действие обнаружено при действии мелаксена. По-видимому, мелаксен, содержащий в своем составе мелатонин, оказывает прямое действие на свободнорадикальный гомеостаз в тканях млекопитающих при ОС. Эпифамин, способен оказывать опосредованное



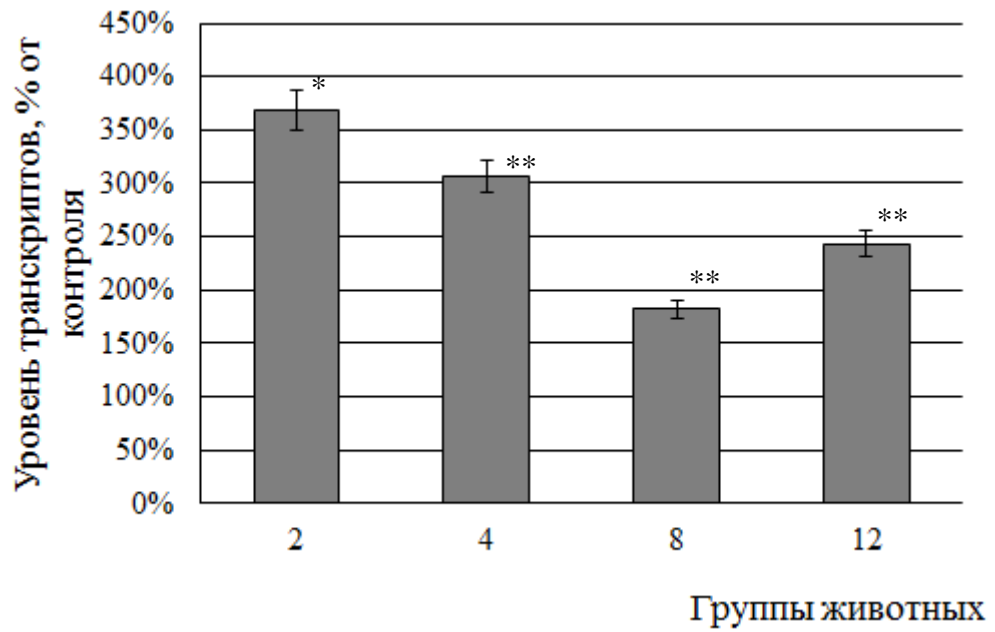
а



б



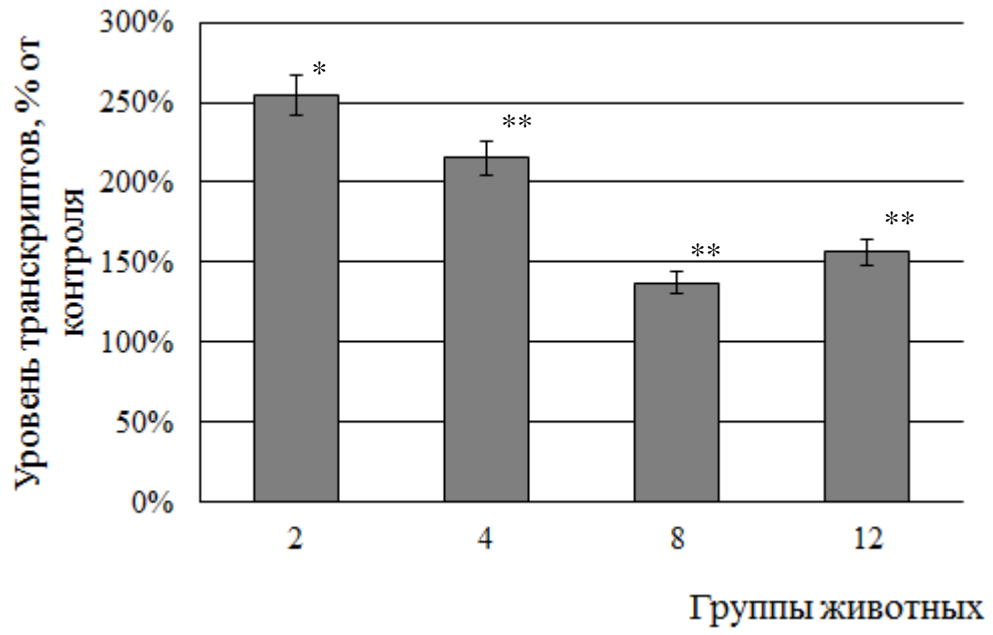
в



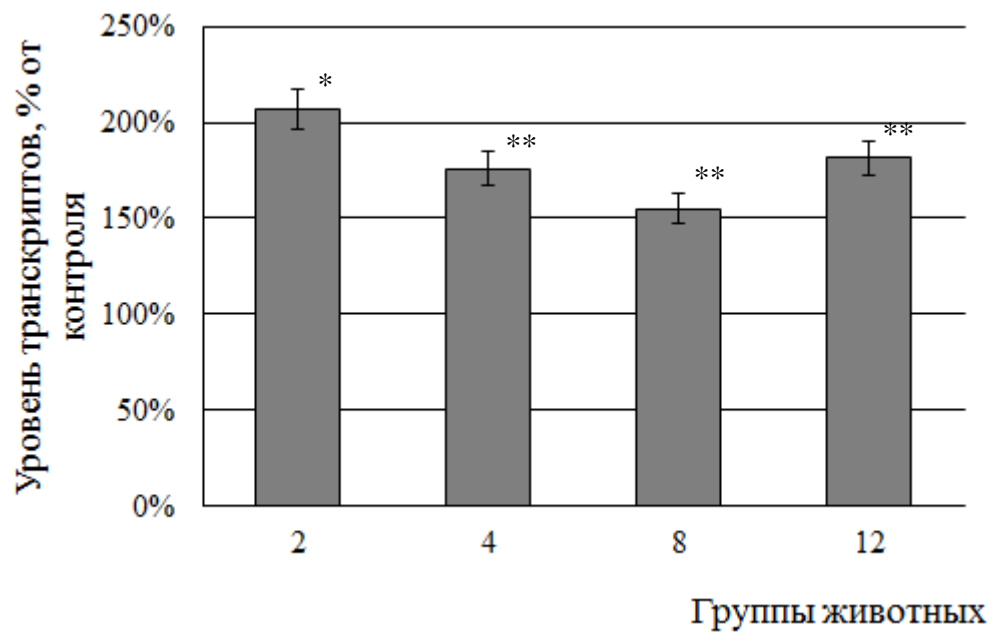
г

Рис. 24. Уровень транскриптов гена Sod1 в печени (а), почках (б), крови (в) и сердце (г) крыс с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина (4), мелаксена (8) и вальдоксана (12)

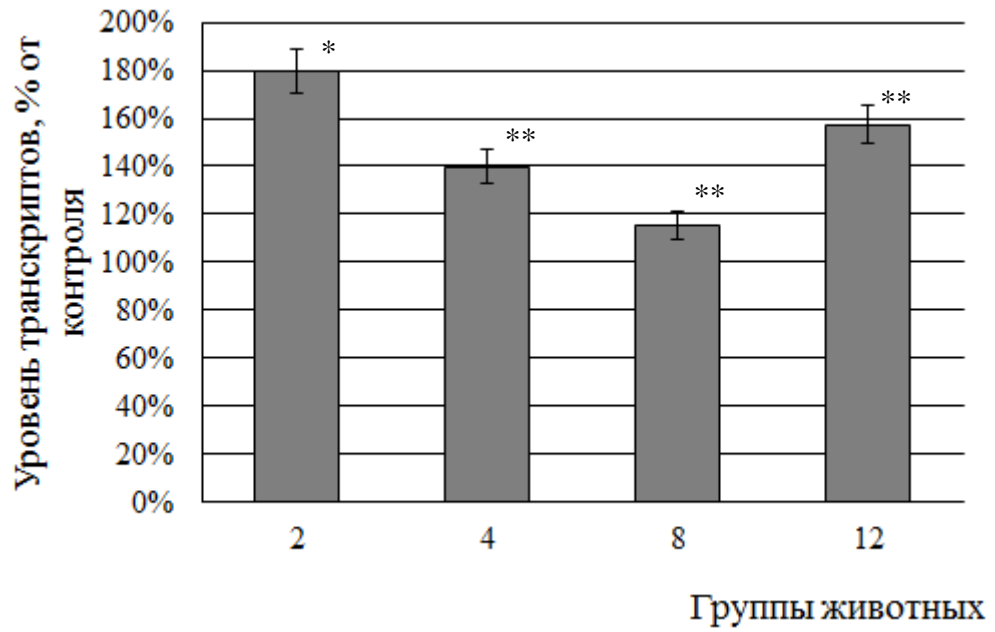
Примечание: здесь и на рисунках 25-27, 53-56 за 100% принимали значения в контрольной группе



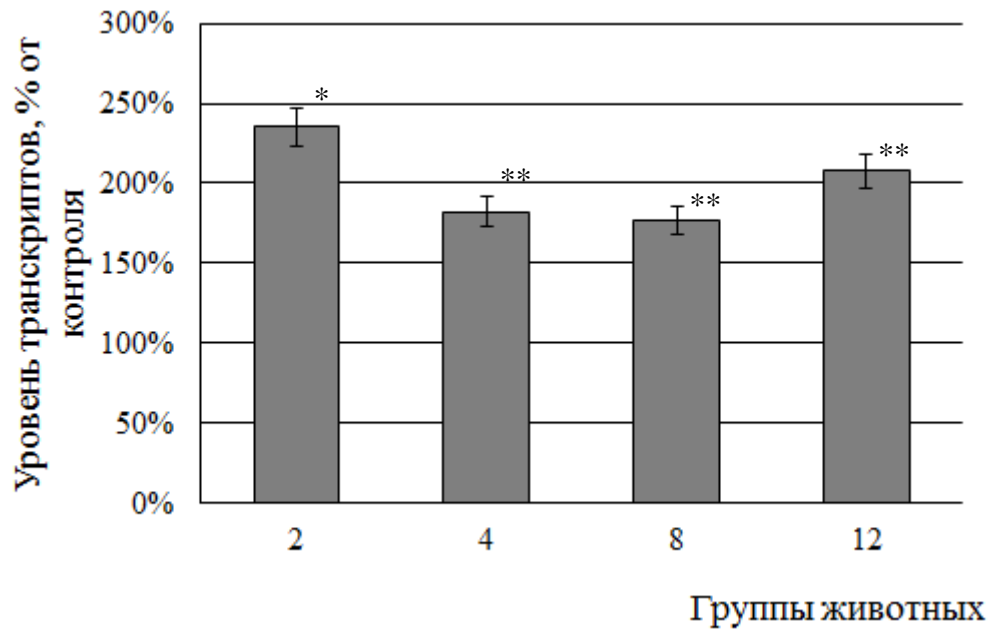
а



б

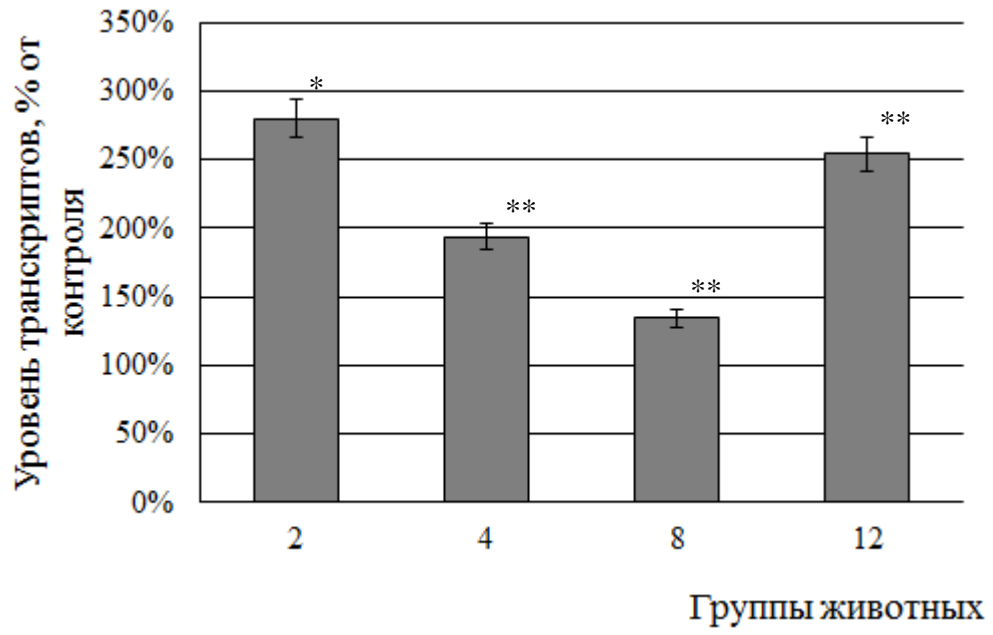


в

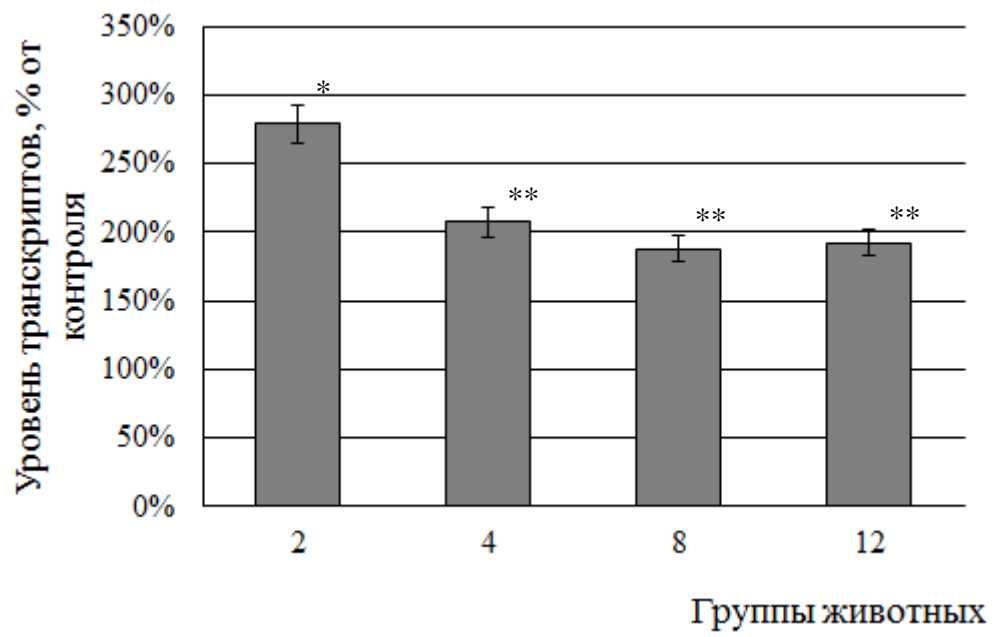


г

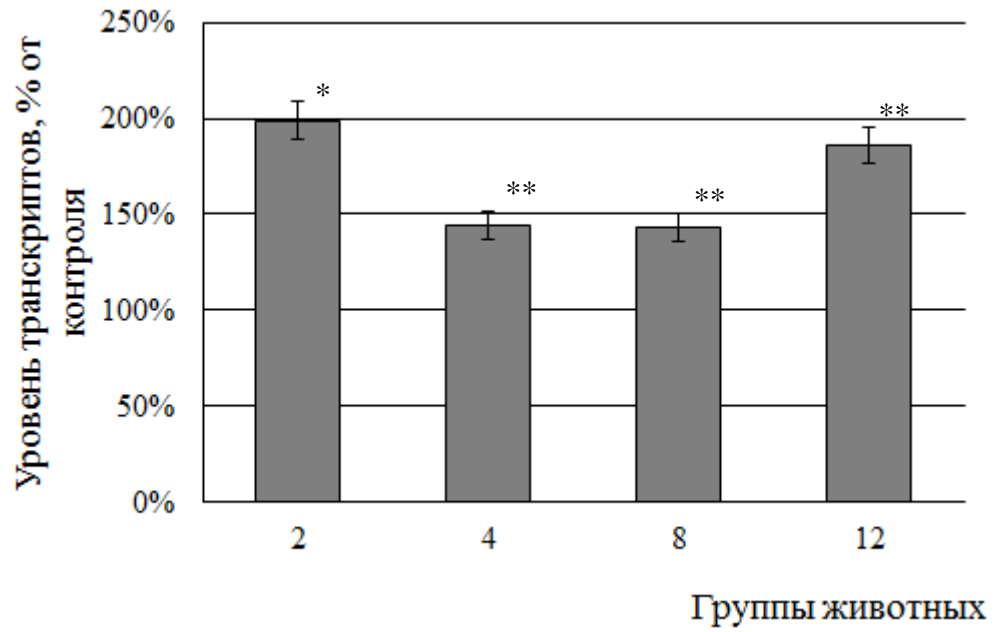
Рис. 25. Уровень транскриптов гена Cat в печени (а), почках (б), крови (в) и сердце (г) крыс с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина (4), мелаксена (8) и вальдоксана (12)



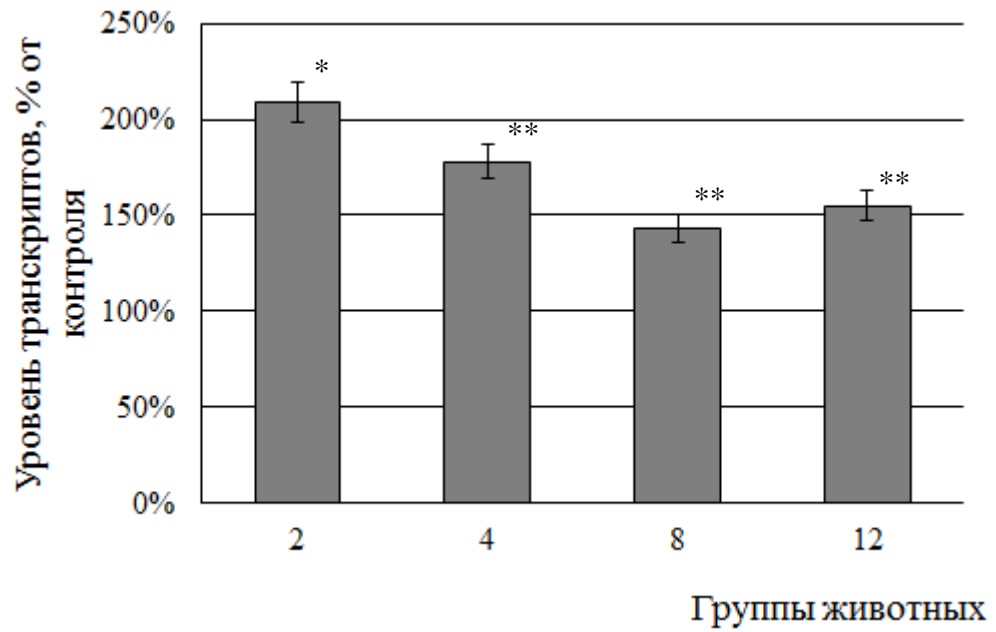
а



б

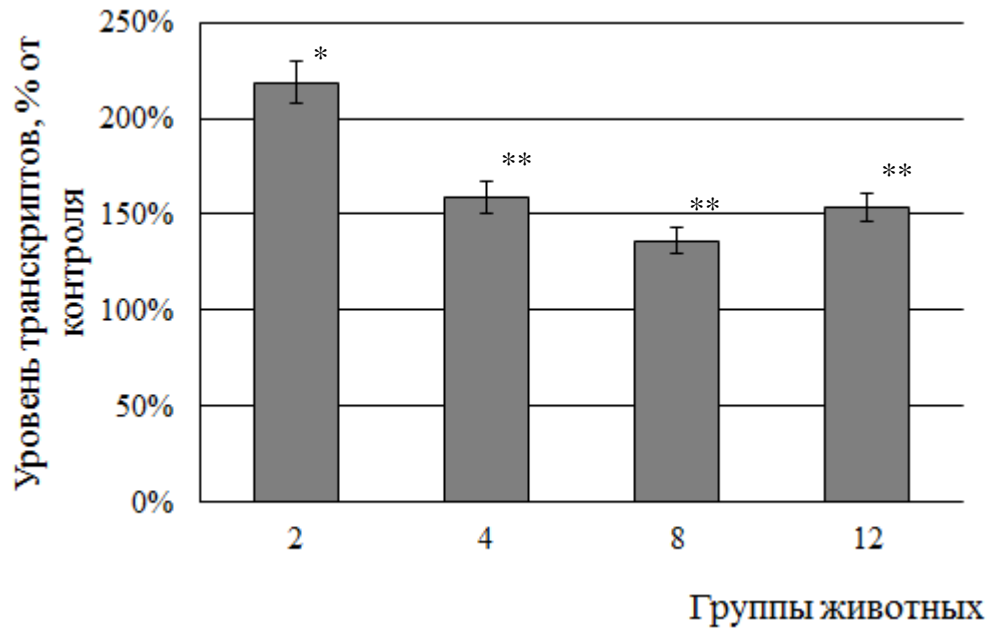


в

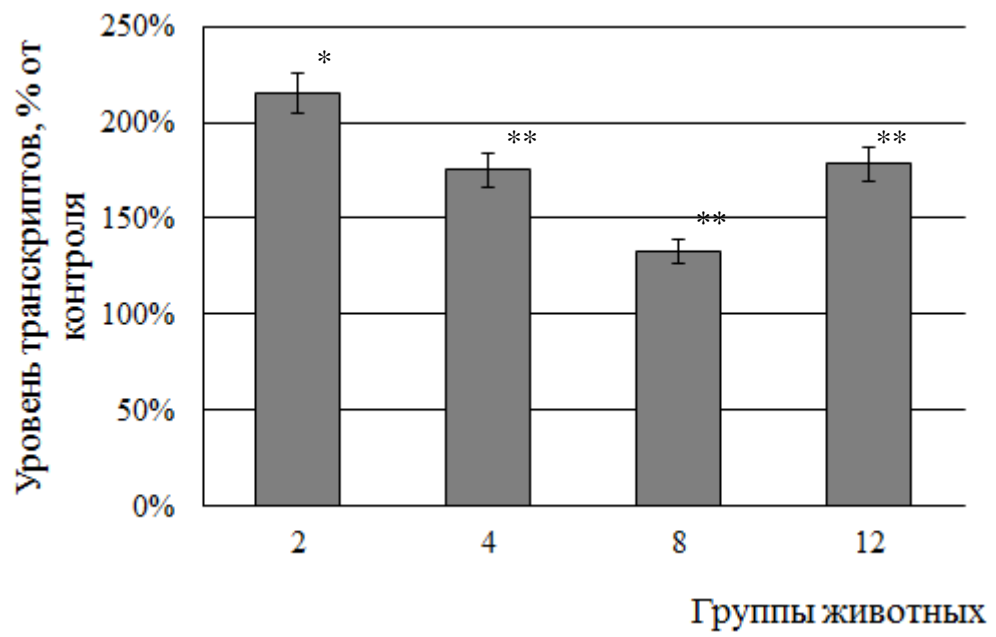


г

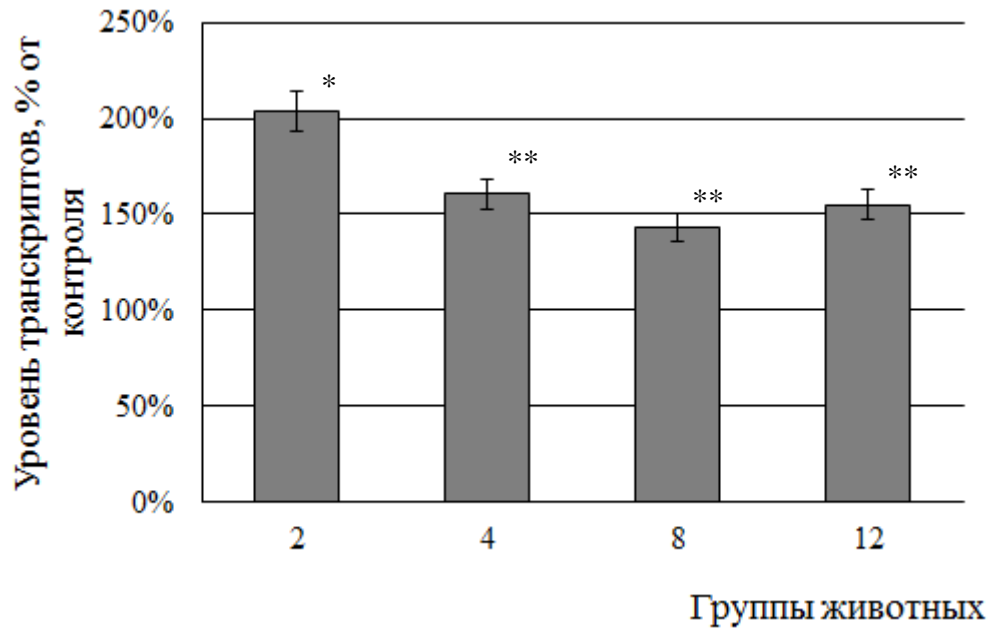
Рис. 26. Уровень транскриптов гена Grx1 в печени (а), почках (б), крови (в) и сердце (г) крыс с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина (4), мелаксена (8) и вальдоксана (12)



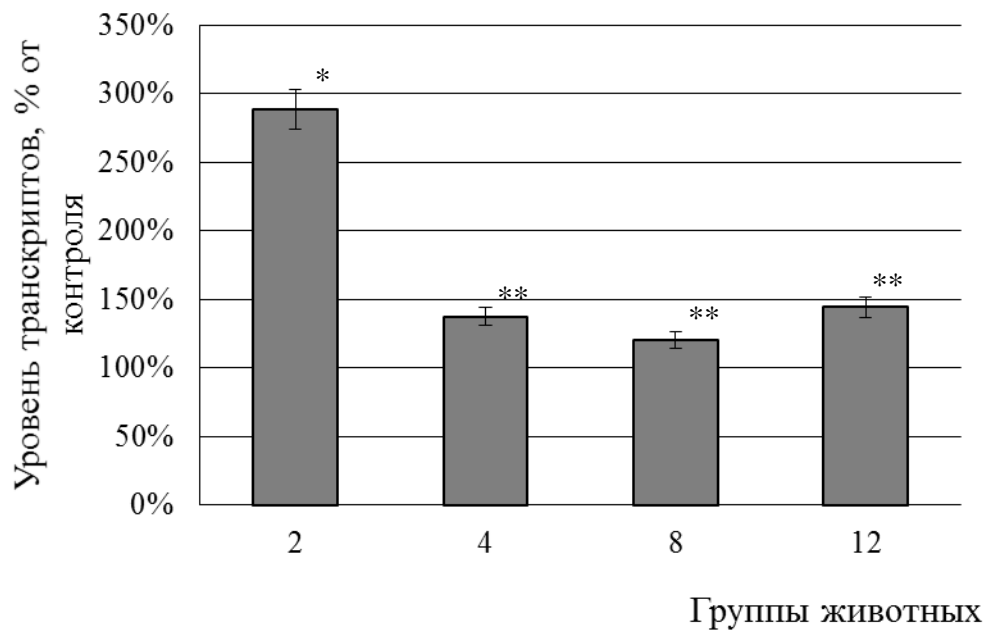
а



б



в



г

Рис. 27. Уровень транскриптов гена Gsr в печени (а), почках (б), крови (в) и сердце (г) крыс с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина (4), мелаксена (8) и вальдоксана (12)

воздействие на уровень мелатонина, повышая его синтез, в связи с чем, очевидно, действие данного препарата было менее выражено в условиях эксперимента. Наряду с этим эффект вальдоксана был также менее значимым по сравнению с мелаксеном, что, вероятно, связано с его опосредованным влиянием на уровень АФК при связывании с рецепторами мелатонина.

Для оценки специфичности метода ПЦР в режиме реального времени был проведен постаmplификационный анализ кривых плавления. В результате было показано, что каждый образец характеризовался одним преобладающим пиком, что соответствовало единственной полосе на электрофореграмме (рис. 28, 29). Наличие одного четко выраженного пика кривых плавлений свидетельствует о специфичности использованных праймеров.

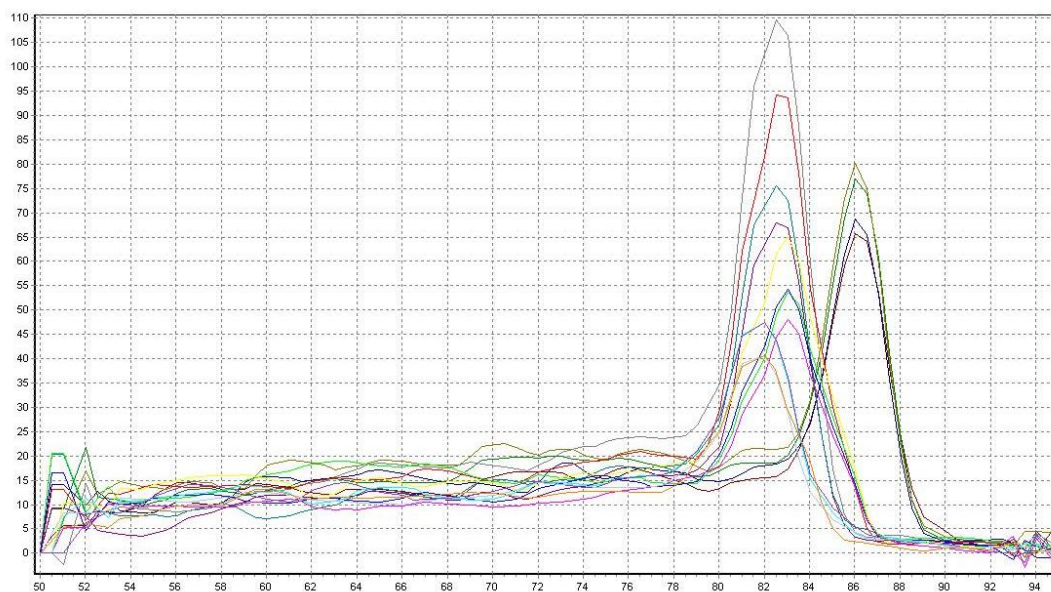


Рис. 28. Кривые плавления продуктов амплификации ПЦР

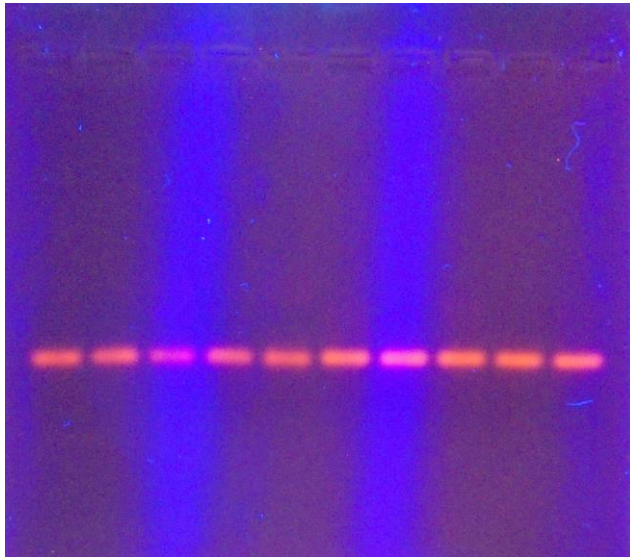


Рис. 29. Электрофереграмма продуктов амплификации ПЦР

ГЛАВА 4. ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕЛАТОНИН-КОРРИГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ МЕЛАТОНИН-КОРРИГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

4.1. Воздействие эпифамина и мелаксена на маркерные показатели развития экспериментального ревматоидного артрита у крыс

Важными диагностическими показателями, характеризующими интенсивность и степень повреждения при развитии РА, являются определение уровня РФ и СОЭ.

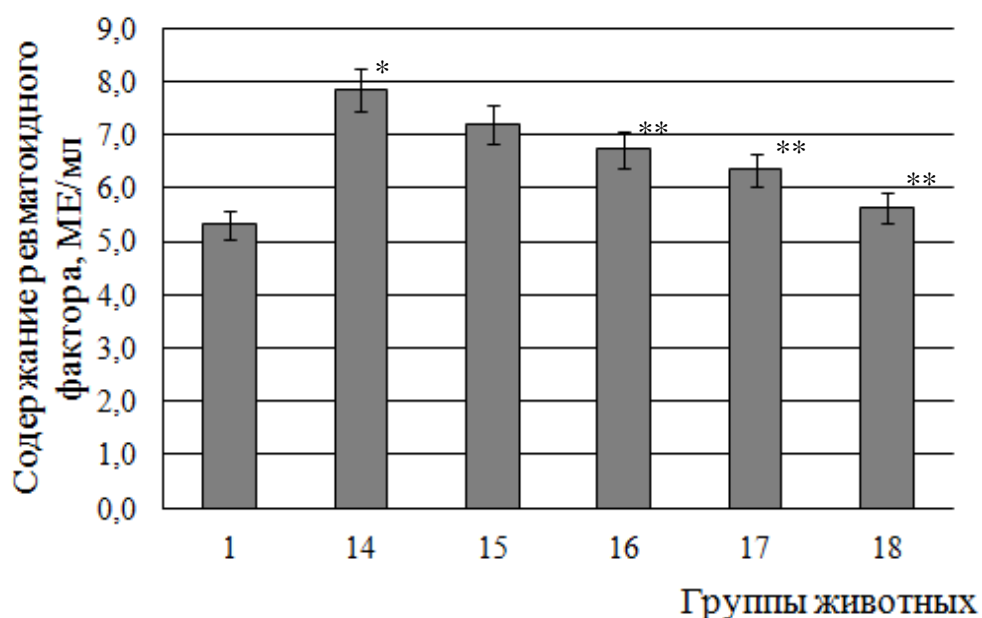


Рис. 30. Содержание ревматоидного фактора в сыворотке крови крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)

Примечание: здесь, на рисунках 31-56 и в таблицах 8-9 различия достоверны при $p < 0,05$; (*) - по сравнению с контрольной группой, (**) - по сравнению с группой с РА.

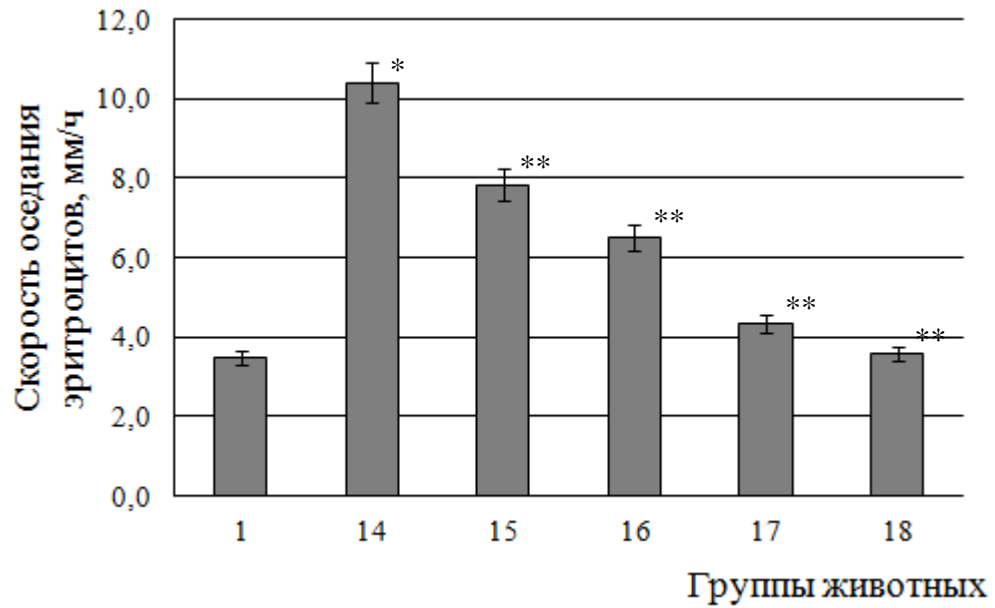


Рис. 31. Скорость оседания эритроцитов в крови крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)

Было показано, что при развитии заболевания происходит возрастание значений РФ и СОЭ, что свидетельствует о манифестации заболевания у исследуемых животных (рис. 30, 31).

Введение мелатонин-корректирующих препаратов крысам с экспериментальным РА приводило к снижению уровня РФ и СОЭ. Так, содержание РФ достоверно уменьшалось только при введении максимальной дозы эпифамина 2,5 мг/кг в 1,2 раза. При действии эпифамина в дозах 1,2 и 2,5 мг/кг наблюдалось снижение СОЭ в 1,3 и 1,6 раза. На фоне введения мелаксена в дозе 5,0 мг/кг животным с патологией наблюдалось снижение РФ в 1,2 раза и СОЭ в 2,4 раза, в дозе 10 мг/кг – в 1,4 и 2,9 раза соответственно (рис. 30, 31). Вероятно, полученные данные об изменении маркерных показателей развития заболевания при введении исследуемых препаратов обусловлены опосредованным воздействием данных веществ на иммунную систему путем коррекции уровня мелатонина в организме.

Известно, что при РА мелатонин способен снижать избыточную пролиферацию фибробластоподобных синовиоцитов посредством активации циклин-зависимых ингибиторов киназ P21 (CIP1) и P27 (Kip1), опосредованно, через ERK сигнальный путь [174]. Согласно данным литературы, мелатонин оказывает модулирующее действие на различные параметры иммунной системы, что может способствовать снижению острого и хронического воспаления. Так, в частности, показано, что данный гормон снижал уровень мРНК и уровень провоспалительных цитокинов – ФНО- α и ИЛ-1 β в печени грызунов [171, 176].

4.2. Оценка интенсивности свободнорадикального окисления в мышцах и сыворотке крови крыс с экспериментальным ревматоидным артритом при введении мелатонин-корректирующих препаратов

4.2.1. Влияние эпифамина и мелаксена на интенсивность биохемилюминесценции и уровень первичных продуктов пероксидного окисления липидов в исследуемых тканях крыс с экспериментальным ревматоидным артритом

В ходе проведенного исследования было установлено, что при введении эпифамина и мелаксена наблюдается снижение параметров БХЛ, возрастающих при развитии экспериментального РА. Так, показано, что у животных с патологией, которым вводили эпифамин в дозе 1,2 мг/кг, происходило снижение параметра S в сыворотке крови и мышцах на 12% и 11%, в дозе 2,5 мг/кг – на 33% и 31% соответственно по сравнению с животными с РА. При этом значение I_{\max} уменьшалось в 1,4 и 1,5 раза в сыворотке и в 1,1 и 1,3 раза в мышцах. Сходные изменения были отмечены и при использовании мелаксена в качестве протектора. Введение данного препарата в дозе 5,0 мг/кг приводило к снижению S и I_{\max} в сыворотке крови на 14% и 30%, в мышцах – на 23% и 19% соответственно. При использовании

мелаксена в дозе 10 мг/кг наблюдалось уменьшение значений S и I_{\max} в сыворотке в 1,4 раза и в мышцах в 1,3 раза (табл. 8, 9).

Введение исследуемых мелатонин-корректирующих препаратов крысам с экспериментальным РА снижало значение $tg\alpha_2$. Так, в сыворотке крови данный параметр уменьшался при введении эпифамина в дозах 1,2 и 2,5 мг/кг в 1,4 раза, в мышцах – в 1,2 и 1,5 раза соответственно. При введении мелаксена в исследуемых дозах $tg\alpha_2$ снижался в 1,1 и 1,8 раза в сыворотке и в 1,2 и 1,3 раза в мышцах (табл. 8, 9).

Таблица 8. Значения параметров биохемилюминесценции в сыворотке крови экспериментальных животных

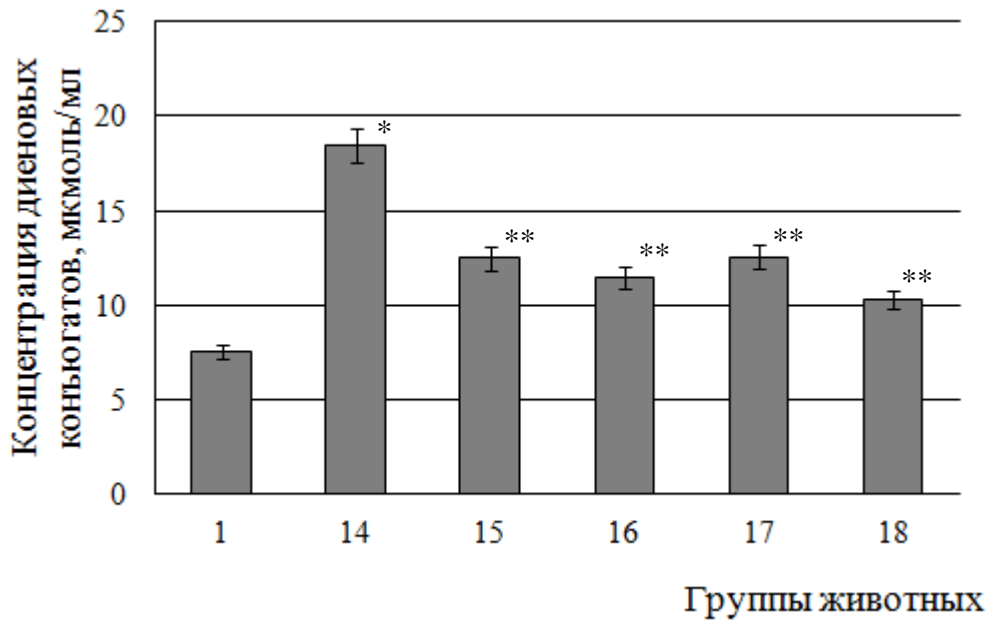
Группы животных	Светосумма вспышки хемилюминесценции (S), mV * с	Интенсивность максимальной вспышки (I_{\max}), mV	Тангенс угла наклона кинетической кривой ($tg\alpha_2$)
1	903,00±13,66	68,50±2,22	14,05±0,60
14	1197,00±33,20*	102,50±3,30*	24,10±0,82*
15	1071,90±36,12**	74,33±2,18**	16,67±0,55**
16	898,98±20,14**	67,09±2,66**	16,66±0,40**
17	1049,90±19,30**	78,84±1,91**	21,21±0,71**
18	828,28±25,17**	74,19±2,64**	13,15±0,33**

Таблица 9. Значения параметров биохемилюминесценции в мышцах экспериментальных животных

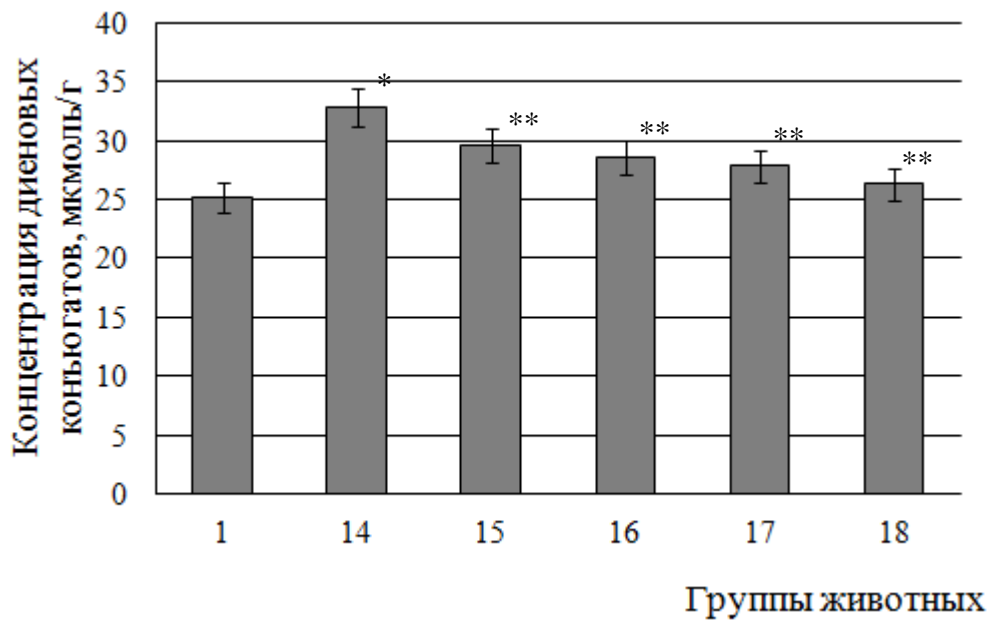
Группы животных	Светосумма вспышки хемилюминесценции (S), mV * с	Интенсивность максимальной вспышки (I_{\max}), mV	Тангенс угла наклона кинетической кривой ($tg\alpha_2$)
1	528,05±14,55	91,40±3,49	34,55±1,05
14	675,17±21,07*	131,14±3,32*	48,83±1,20*
15	607,15±18,01**	115,55±2,06**	40,32±1,54**
16	517,32±15,50**	100,80±2,74**	32,37±1,17**
17	547,48±20,63**	110,39±3,28**	41,91±1,30**
18	533,21±13,82**	100,90±4,01**	36,66±1,16**

Выявлено, что внутрибрюшинное введение эпифамина и мелаксена крысам с экспериментальным РА способствовало снижению уровня ДК, возрастающему при патологии. Так, в сыворотке крови содержание первичных продуктов ПОЛ снижалось в 1,5 и 1,6 раза при введении эпифамина в дозах 1,2 и 2,5 мг/кг и в 1,5 и 1,8 раза при действии мелаксена в дозах 5,0 и 10 мг/кг соответственно. При этом, в мышцах крыс концентрация ДК понижалась при введении указанных доз эпифамина на 11% и 15% и мелаксена на 18% и 25% соответственно по сравнению с животными с патологией (рис. 32).

Обнаруженные изменения показателей БХЛ, характеризующих интенсивность СРП, и уровня ДК в направлении контрольных значений свидетельствует о способности исследуемых веществ снижать уровень ОС, а также прерывать цепные реакции ПОЛ при развитии экспериментального РА. Очевидно, что действие эпифамина и мелаксена обусловлено повышением уровня мелатонина в организме животных. Как известно, данный гормон является антиоксидантом широкого спектра, а механизмы его действия зависят от типа нейтрализуемого радикала, где он может выступать в качестве донора или акцептора электронов, ловушки свободных радикалов, вступать в реакции присоединения и замещения. Кроме того, антиоксидантной активностью обладают и продукты взаимодействия мелатонина с АФК – АФМК, N-ацетил-5-метоксикинурамин и 6-гидроксимелатонин [169, 229].



а



б

Рис. 32. Содержание диеновых конъюгатов в сыворотке крови (а) и мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)

4.2.2. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на активность каспаз в мышцах крыс с экспериментальным ревматоидным артритом

Согласно полученным ранее данным, при развитии экспериментального РА наблюдается увеличение активности ключевых маркеров апоптоза – каспазы-3 и -8 по сравнению с контрольной группой животных [16]. Введение эпифамина в дозе 2,5 мг/кг приводило к снижению активности каспазы-3 в мышцах крыс с РА в 2,2 раза и каспазы-8 – в 1,8 раза относительно значений животных с патологией (рис. 33). При действии мелаксена в дозе 10 мг/кг на фоне развития РА наблюдалось уменьшение активности каспаз-3 и -8 в 2,8 и 2,5 раза соответственно. Полученные данные об изменении активности каспаз, свидетельствуют о способности исследуемых препаратов оказывать антиапоптотический эффект, снижая интенсивность СРП в организме животных.

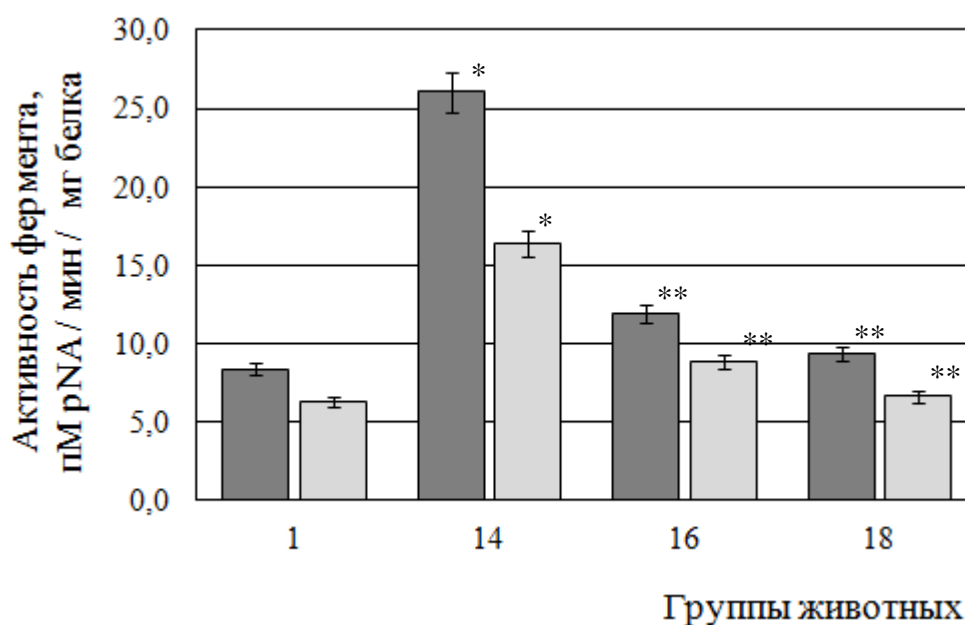


Рис. 33. Активность каспазы 3 (■) и каспазы 8 (□) в мышцах крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина (16) и мелаксена (18)

4.2.3. Влияние эпифамина и мелаксена на степень фрагментации ДНК в мышцах крыс с экспериментальным ревматоидным артритом

В ходе анализа электрофореграммы образцов ДНК из мышечной ткани крыс установлено, что введение эпифамина и мелаксена крысам с экспериментальным РА способствует значительному снижению степени фрагментации ДНК, возникающей при патологии. Так, в образцах ДНК, животных, которым вводили протекторы, не было выявлено совокупности полос, соответствующей низкомолекулярной ДНК, что указывает на способность исследуемых мелатонин-корректирующих препаратов оказывать антиапоптотический эффект.

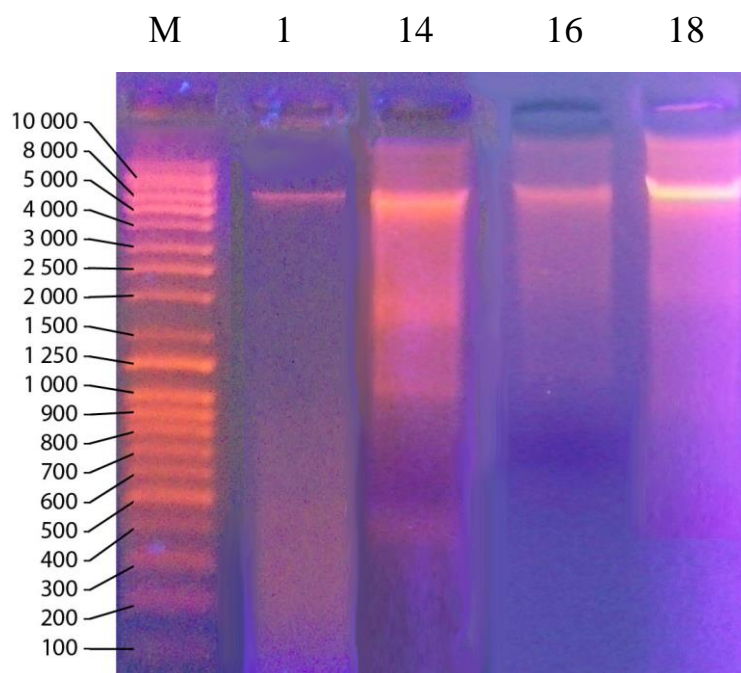
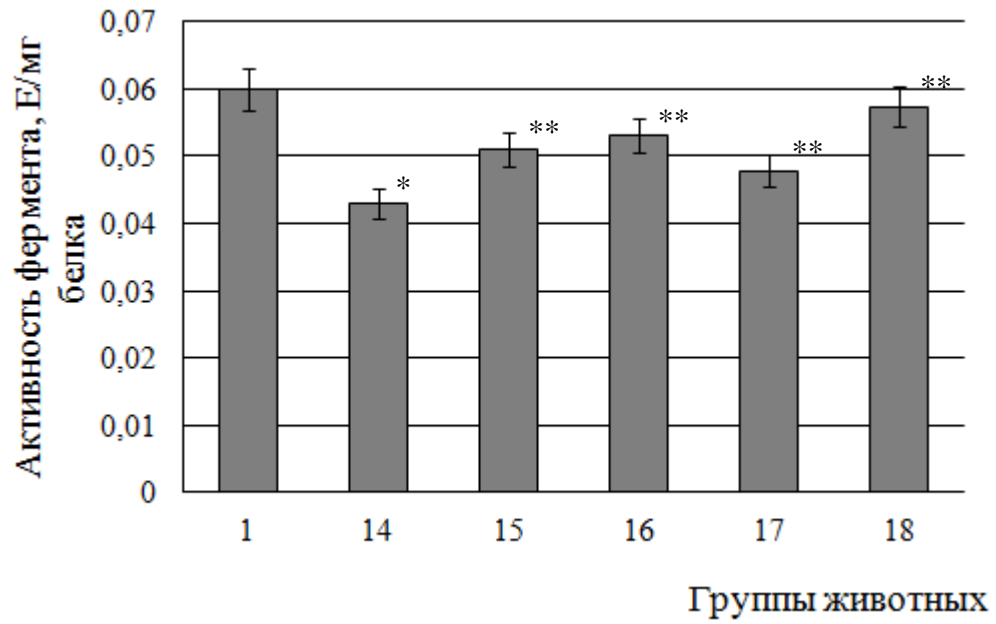


Рис. 34. Электрофореграмма образцов ДНК из мышечной ткани крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина (16) и мелаксена (18)

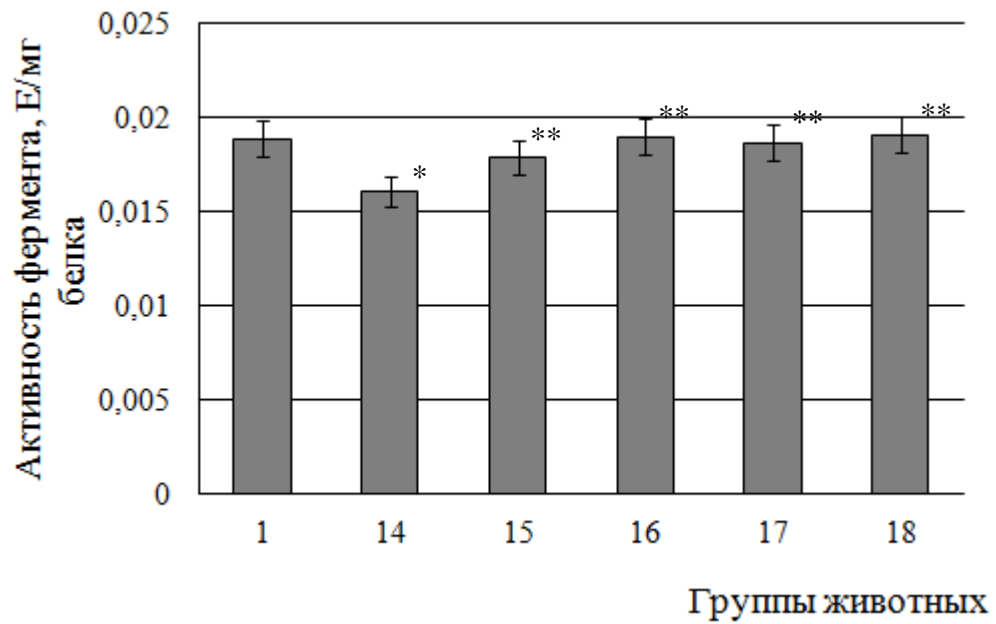
4.2.4. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на активность аконитатгидратазы и уровень цитрата в исследуемых тканях крыс при развитии экспериментального ревматоидного артрита

Отмечено, что при развитии экспериментального РА наблюдается снижение активности АГ и рост концентрации цитрата [25]. При этом введение эпифамина в дозе 1,2 мг/кг и мелаксена в дозе 2,5 мг/кг на фоне развития патологии приводило к увеличению удельной активности АГ, снижающейся в патологическом состоянии, в сыворотке крови в 1,1 раза и в мышцах в 1,2 раза. Также, рост активности фермента отмечен при действии эпифамина в дозе 5,0 мг/кг в сыворотке и мышцах на 24% и 18% и мелаксена в дозе 10 мг/кг – на 34% и 19% соответственно. Изменения активности фермента, выраженной в Е/мл и Е/г сырой массы, характеризовались сходной тенденцией (рис. 35, 36).

Наряду с этим отмечено снижение концентрации цитрата, возрастающей в патологическом состоянии, при введении эпифамина в сыворотке и мышцах в 1,1 раза (1,2 мг/кг) и в 1,2 раза (2,5 мг/кг). При действии мелаксена в дозах 5,0 и 10 мг/кг концентрация цитрата снижалась в 1,2 и 1,4 раза в сыворотке и в 1,3 и 1,5 раза в мышцах соответственно (рис. 37). По-видимому, введение эпифамина и мелаксена корректировало содержание мелатонина, что способствовало снижению уровня ОС. Как следствие, это приводило к восстановлению активности АГ и ускорению метаболизации цитрата в реакции, катализируемой данным ферментом, что проявлялось в снижении его концентрации в тканях крыс.

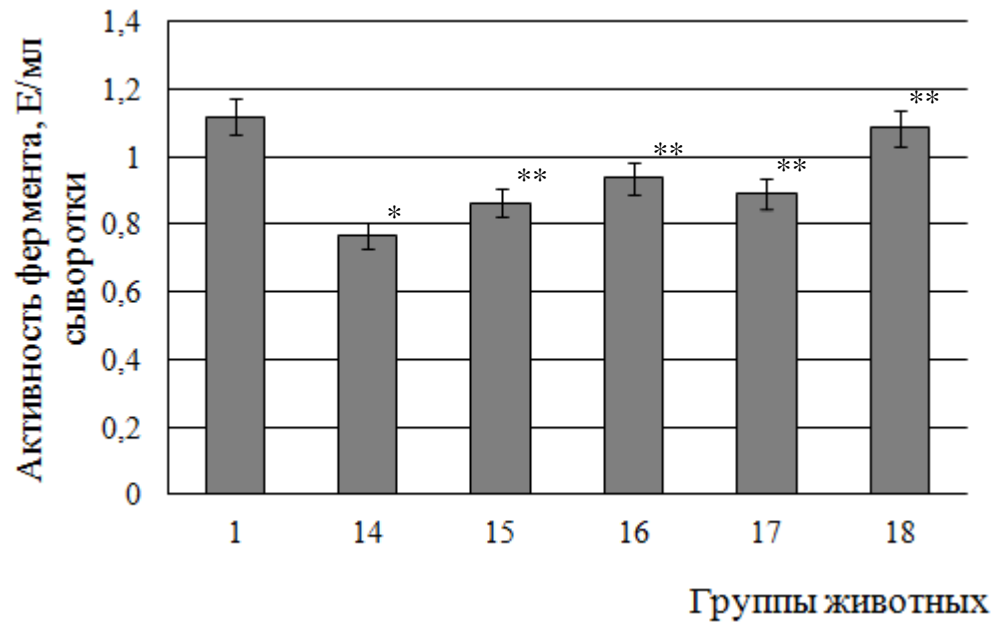


а

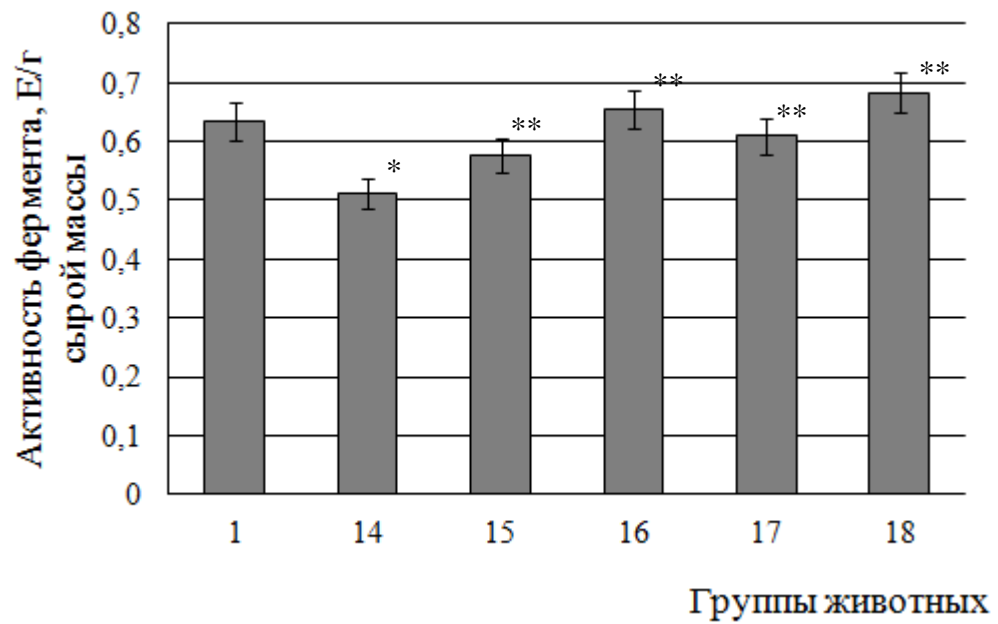


б

Рис. 35. Активность аконитатгидратазы, выраженная в Е/мг белка, в сыворотке крови (а) и мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)

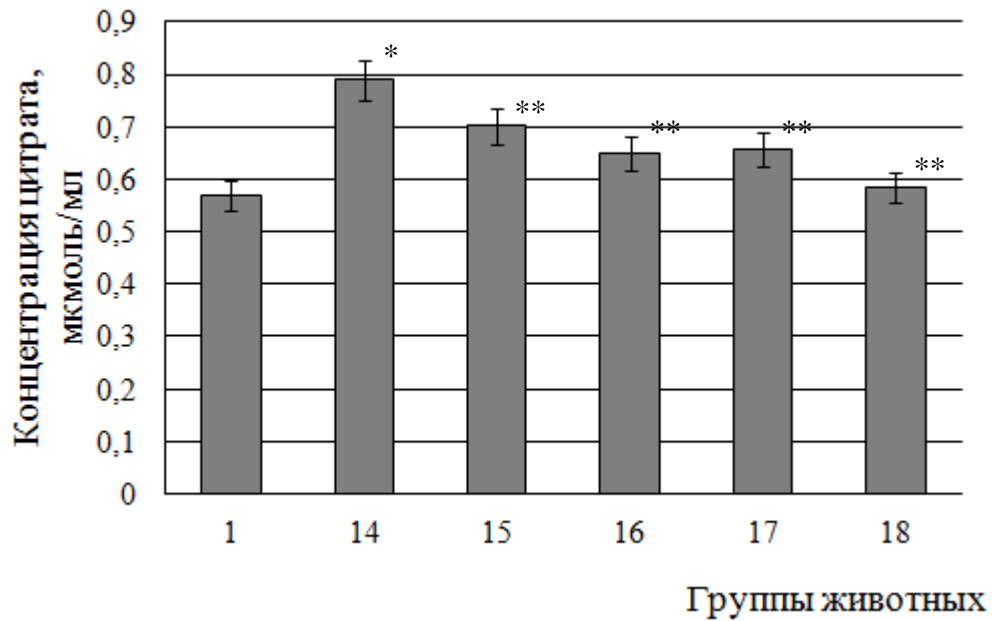


а

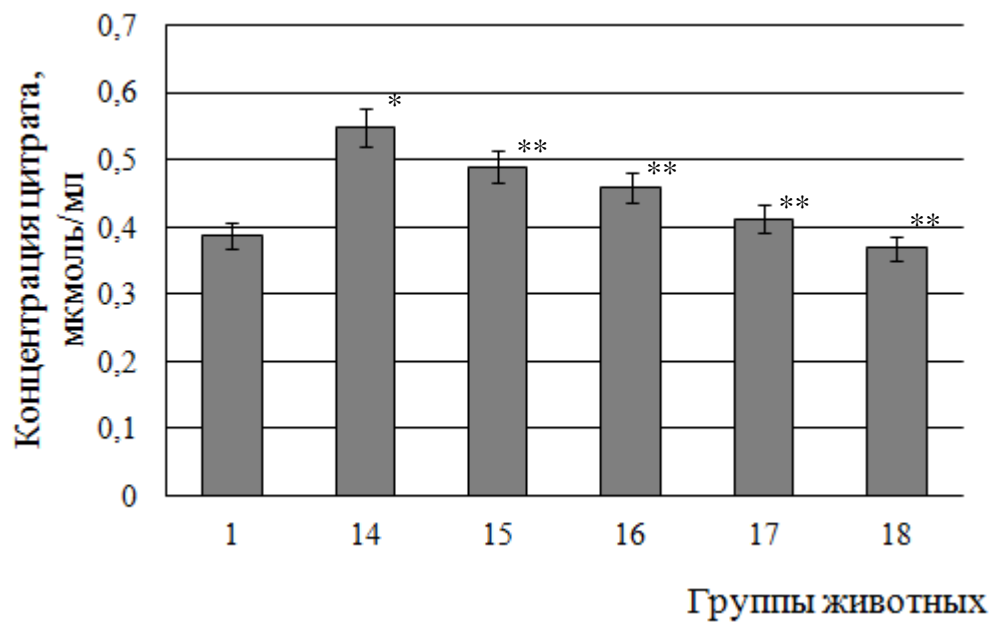


б

Рис. 36. Активность аконитатгидратазы, выраженная в Е/мл, в сыворотке крови (а) и в Е/г сырой массы в мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)



а



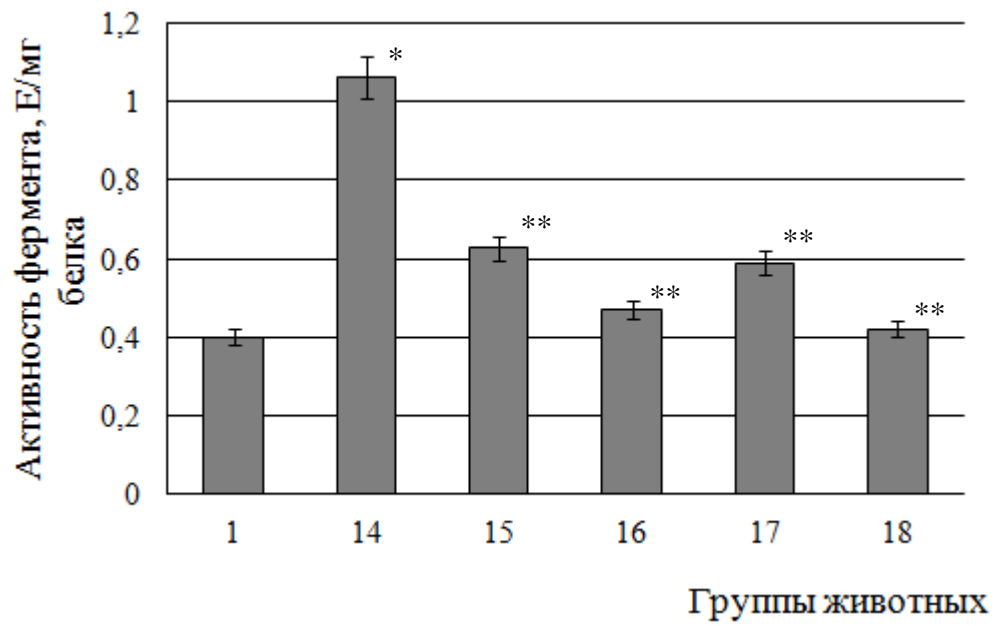
б

Рис. 37. Содержание цитрата в сыворотке крови (а) и мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)

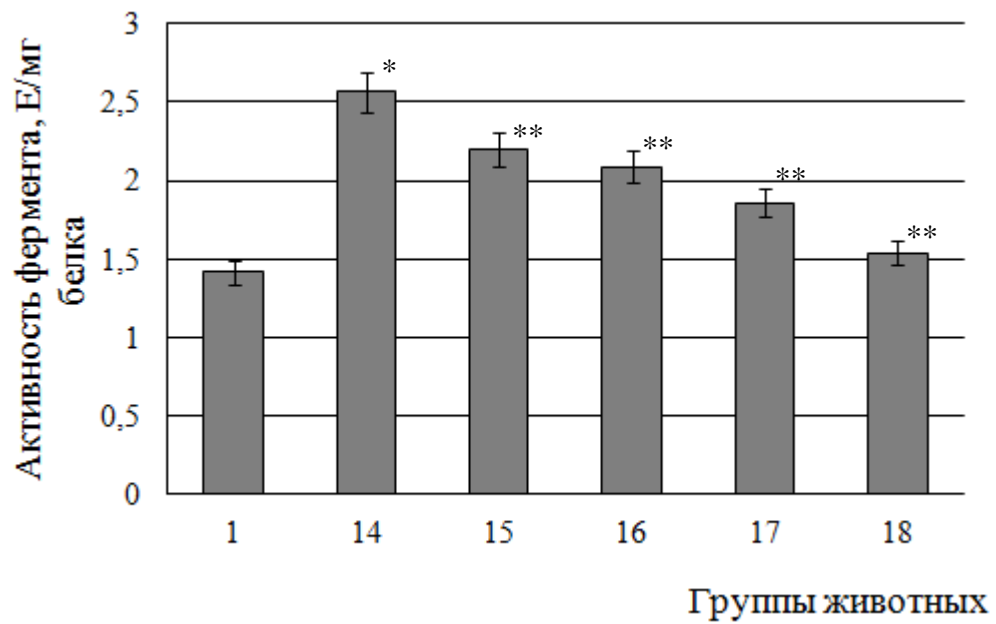
4.3. Оценка антиоксидантного потенциала тканей крыс при действии мелатонин-корректирующих препаратов на фоне развития экспериментального ревматоидного артрита.

4.3.1. Изменение активностей супероксиддисмутазы и каталазы в мышцах и сыворотке крови крыс при введении эпифамина и мелаксена животным с экспериментальным ревматоидным артритом

Согласно полученным данным, введение как эпифамина, так и мелаксена способствовало изменению активности СОД и каталазы, возрастающей при развитии заболевания, в сторону контрольных значений. Так, при действии эпифамина в дозах 1,2 и 2,5 мг/кг удельная активность СОД уменьшалась в 1,7 и 2,3 раза в сыворотке и в 1,2 раза в мышцах. На фоне этого удельная активность каталазы снижалась в сыворотке крови в 1,5 и 2,0 раза и в мышцах в 1,1 и 1,2 раза по сравнению с животными с РА. Применение мелаксена в дозе 5,0 мг/кг уменьшало активность СОД, выраженную в Е/мг белка, в сыворотке крови и мышцах на 80% и 38% и каталазы – на 64% и 18% соответственно (рис. 38, 40). Введение животным с патологией мелаксена в дозе 10мг/кг снижало удельную активность СОД и каталазы в 2,5 и 2,2 раза в сыворотке и в 1,7 и 1,3 раза в мышцах. Сходным образом изменялась активность указанных ферментов, выраженная в Е/мл сыворотки и Е/г сырой массы ткани (рис. 39, 41). Таким образом, показано, что эпифамин в дозе 2,5 мг/кг и мелаксен в дозе 10 мг/кг способны оказывать достаточно эффективное воздействие на свободнорадикальный гомеостаз организма при экспериментальном РА у крыс. При использовании данных мелатонин-корректирующих препаратов в дозах 1,2 и 5,0 мг/кг эффект был менее выражен. Вероятно, это может быть сопряжено с недостаточным проявлением протекторного действия при введении в более низких дозах.

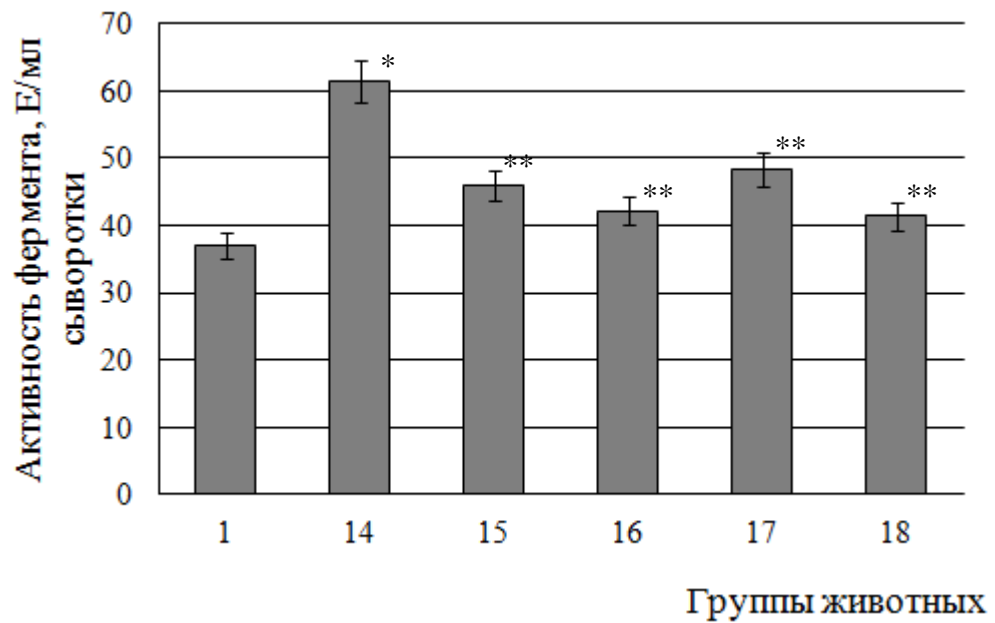


а

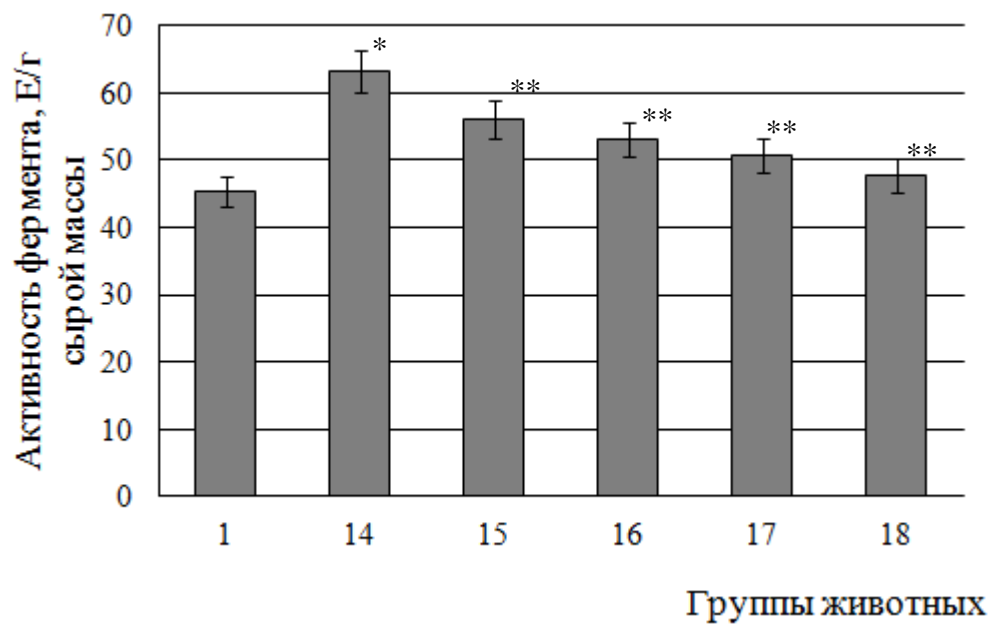


б

Рис. 38. Активность супероксиддисмутазы, выраженная в Е/мг белка, в сыворотке крови (а) и мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)

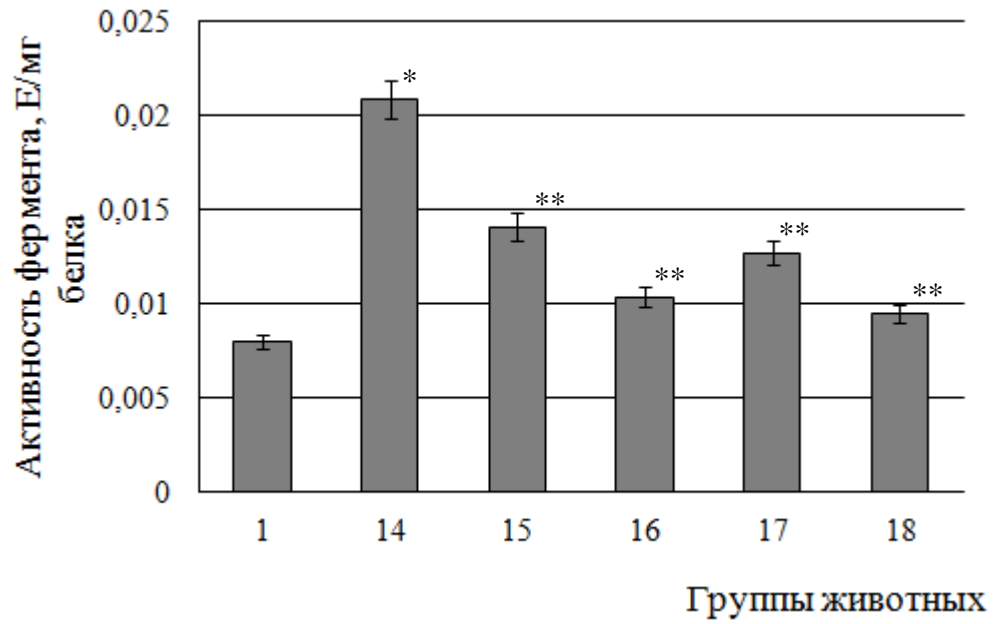


а

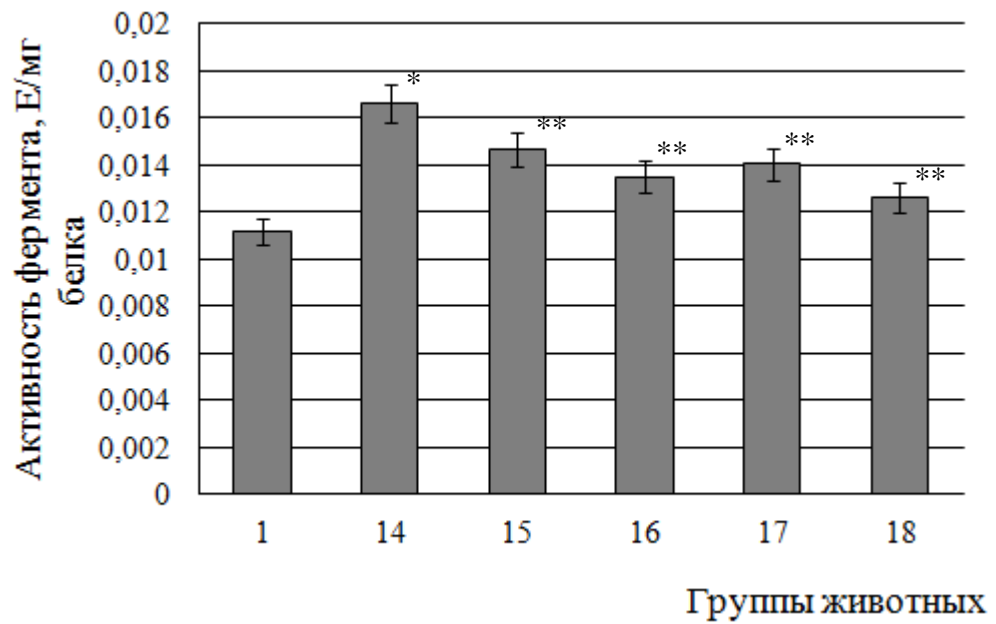


б

Рис. 39. Активность супероксиддисмутазы, выраженная в Е/мл, в сыворотке крови (а) и в Е/г сырой массы в мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)

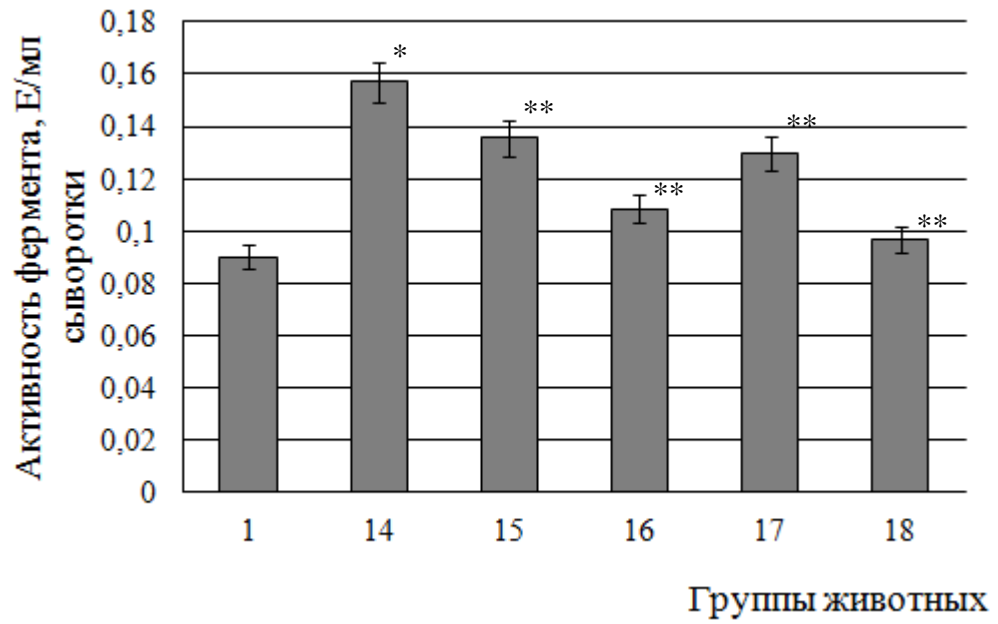


а

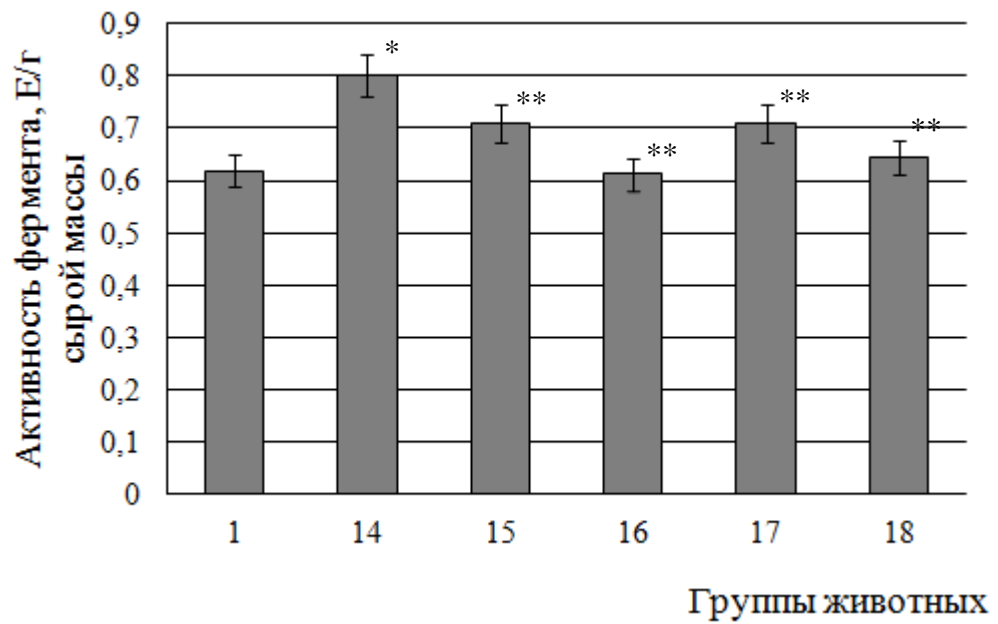


б

Рис. 40. Активность каталазы, выраженная в Е/мг белка, в сыворотке крови (а) и мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)



а

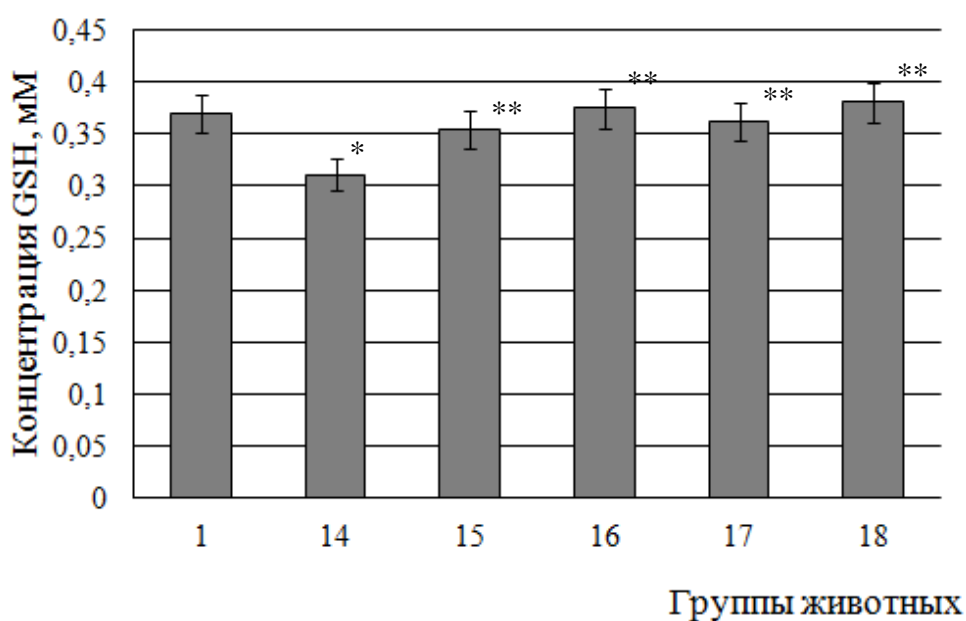


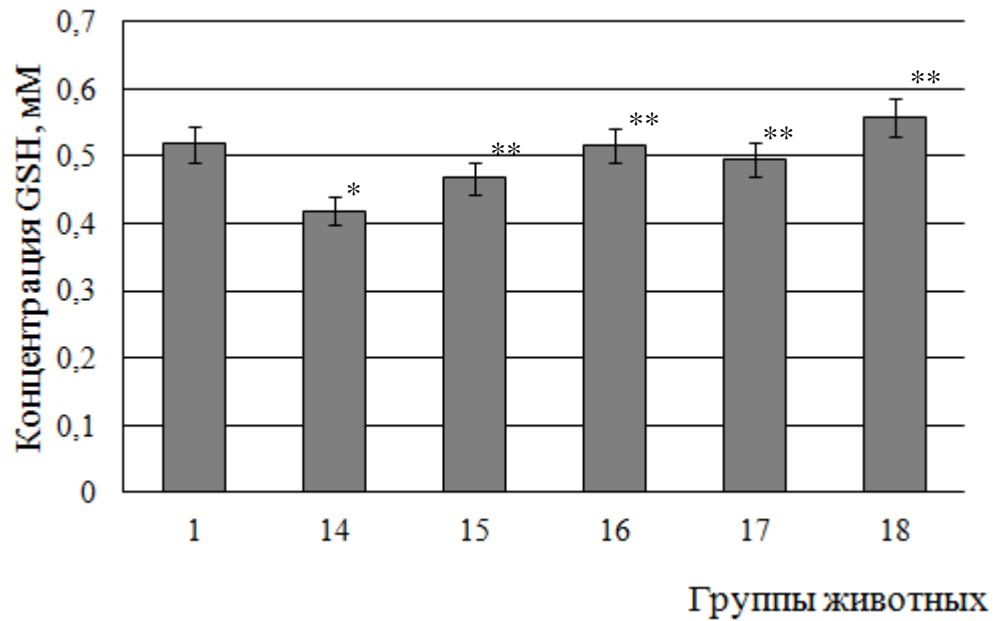
б

Рис. 41. Активность каталазы, выраженная в Е/мл, в сыворотке крови (а) и в Е/г сырой массы в мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)

4.3.2. Влияние мелатонин-корректирующих препаратов на активность глутатионового звена антиоксидантной защиты в тканях крыс при экспериментальном ревматоидном артрите

Введение эпифамина крысам с экспериментальным РА способствовало повышению концентрации GSH, снижающейся при патологии. Так, при действии эпифамина в дозе 1,2 мг/кг наблюдалось возрастание уровня глутатиона в сыворотке на 14% и в мышцах на 12% относительно значений у животных с РА. Применение в качестве протектора эпифамина в дозе 2,5 мг/кг вызывало увеличение содержания GSH в сыворотке и мышцах в 1,2 раза. Возрастание уровня данного тиола отмечено и при действии мелаксена в дозах 5,0 и 10 мг/кг в сыворотке крови в 1,2 раза по сравнению с группой животных с РА. При этом в мышцах содержание GSH увеличивалось в 1,2 и 1,3 раза соответственно (рис. 42). Вероятно, выявленное изменение уровня GSH в направлении нормы может быть результатом проявления антиоксидантного действия исследуемых препаратов, опосредуемого мелатонином. Кроме того, известно, что мелатонин обладает синергичным действием по отношению к GSH, проявляющимся в способности восстанавливать окисленную форму глутатиона.



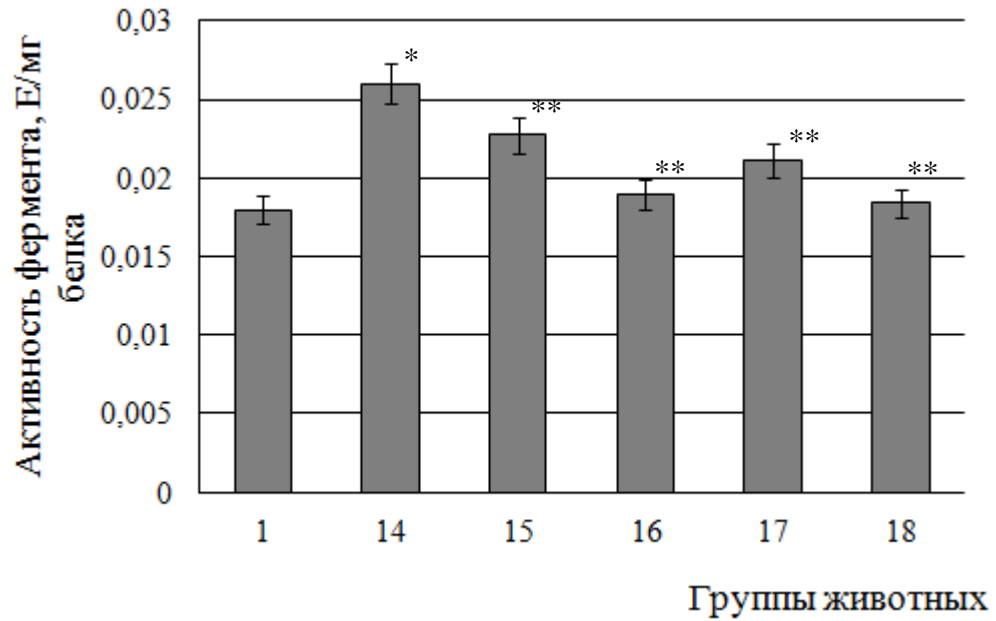


б

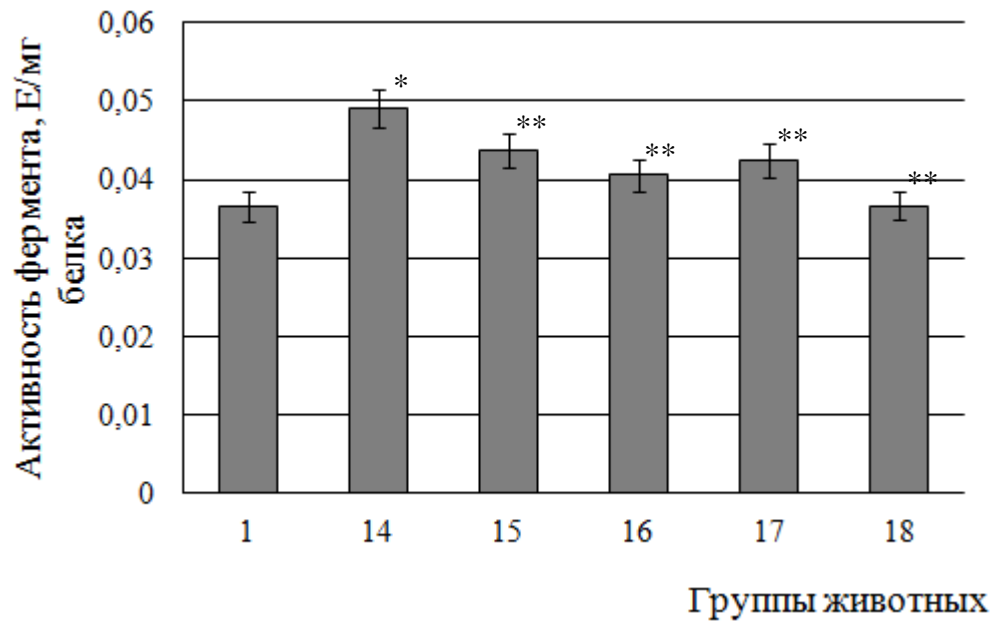
Рис. 42. Концентрация восстановленного глутатиона в сыворотке крови (а) и мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)

Установлено, что при введении исследуемых мелатонин-корректирующих препаратов происходило снижение активности ГП и ГР, возрастающей при патологии. При этом, наибольшим эффектом обладали эпифамин в дозе 2,5 мг/кг и мелаксен в дозе 10 мг/кг. Так, удельная активность ГП в сыворотке крови при введении указанных доз препаратов животным с РА снижалась в 1,4 раза, в мышцах – в 1,2 и 1,3 раза соответственно. Также, отмечено снижение удельной активности ГР при действии эпифамина в дозе 2,5 мг/кг в сыворотке и мышцах в 1,8 и 1,3 раза и мелаксена в дозе 10 мг/кг – в 2,1 и 1,5 раза (рис. 43, 45). Подобной тенденцией характеризовалось изменение активности ГП и ГР, выраженной в Е/мл сыворотки и Е/г сырой массы ткани (рис. 44, 46). Очевидно, введение данных протекторов сопровождалось коррекцией уровня мелатонина, что

приводило к снижению интенсивности СРП в организме животных и уменьшению нагрузки на ферменты глутатионовой АОС.

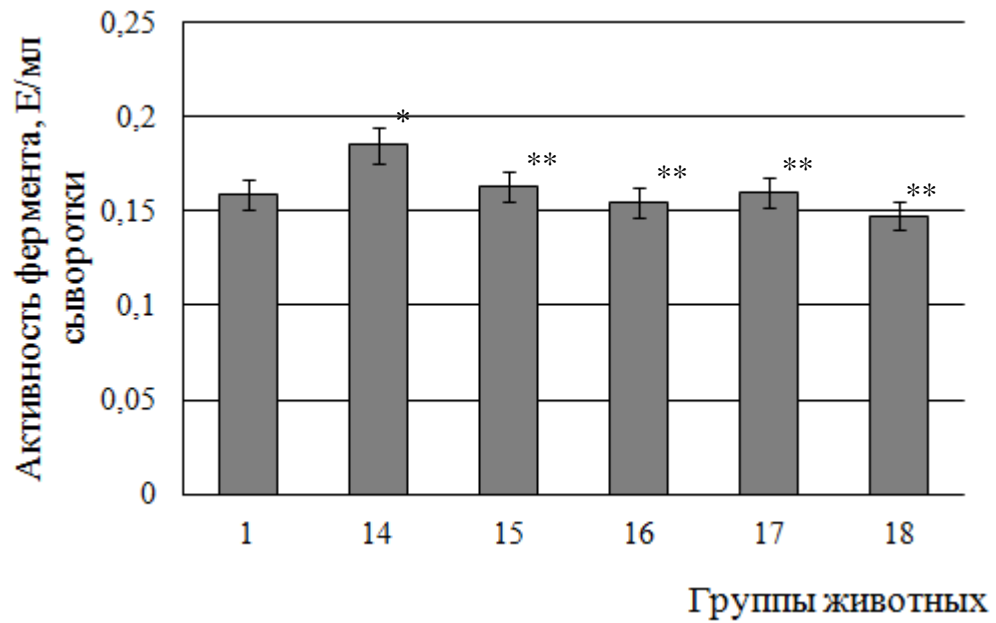


а

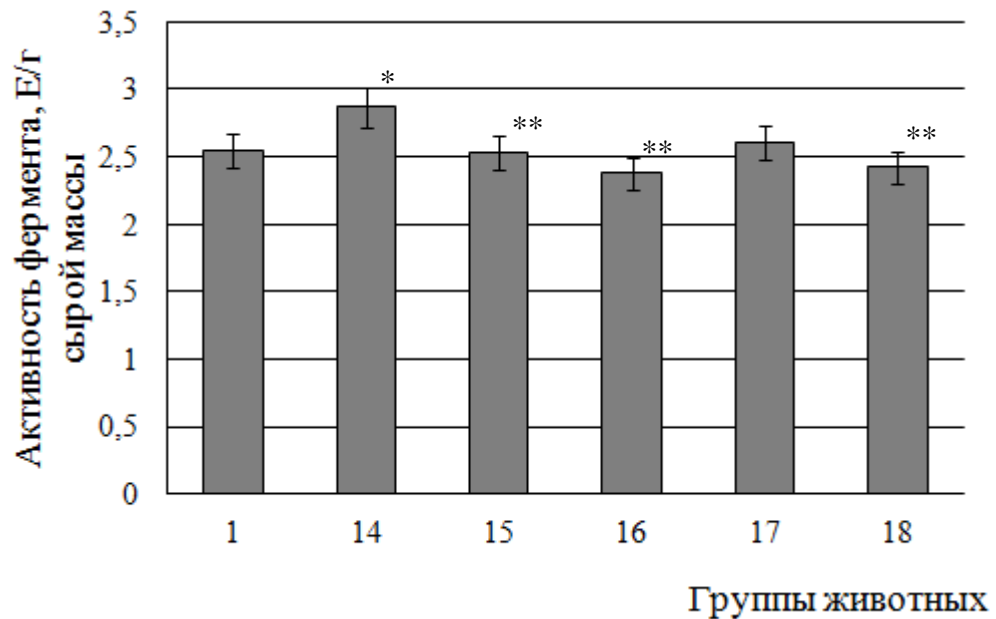


б

Рис. 43. Активность глутатионпероксидазы, выраженная в Е/мг белка, в сыворотке крови (а) и мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)

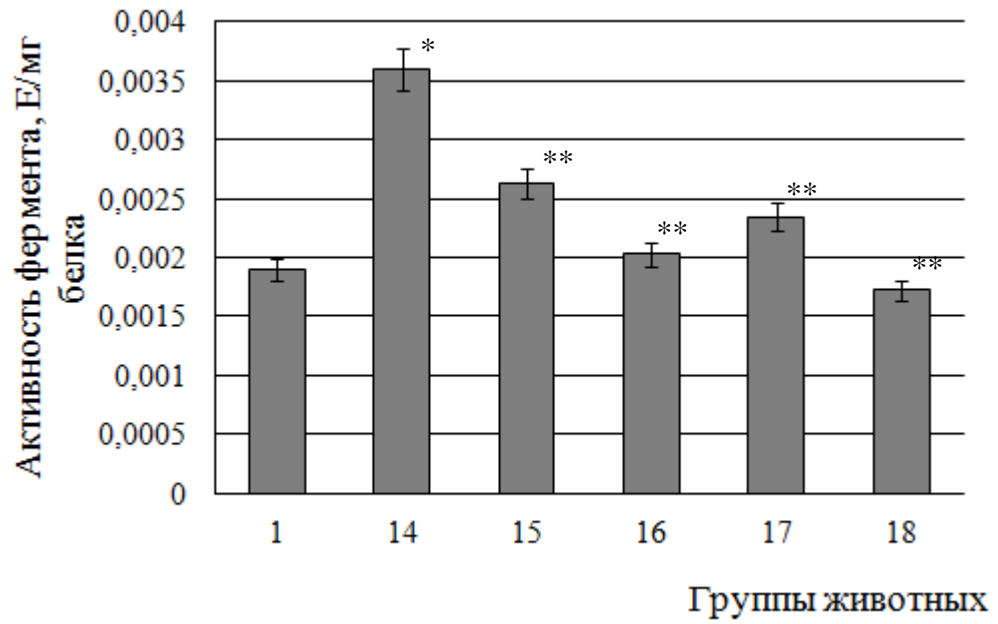


а

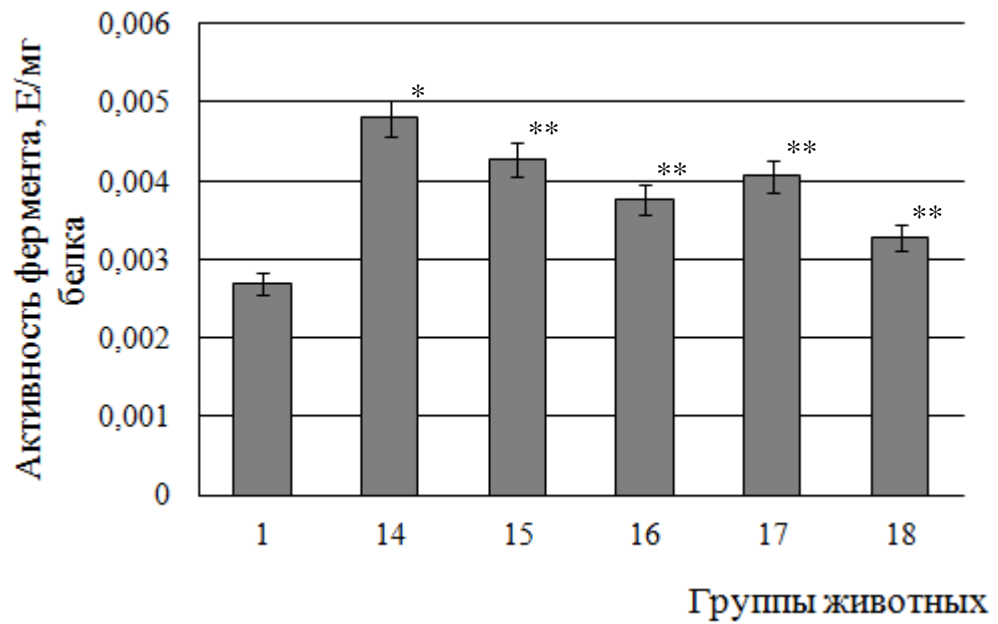


б

Рис. 44. Активность глутатионпероксидазы, выраженная в Е/мл, в сыворотке крови (а) и в Е/г сырой массы в мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)

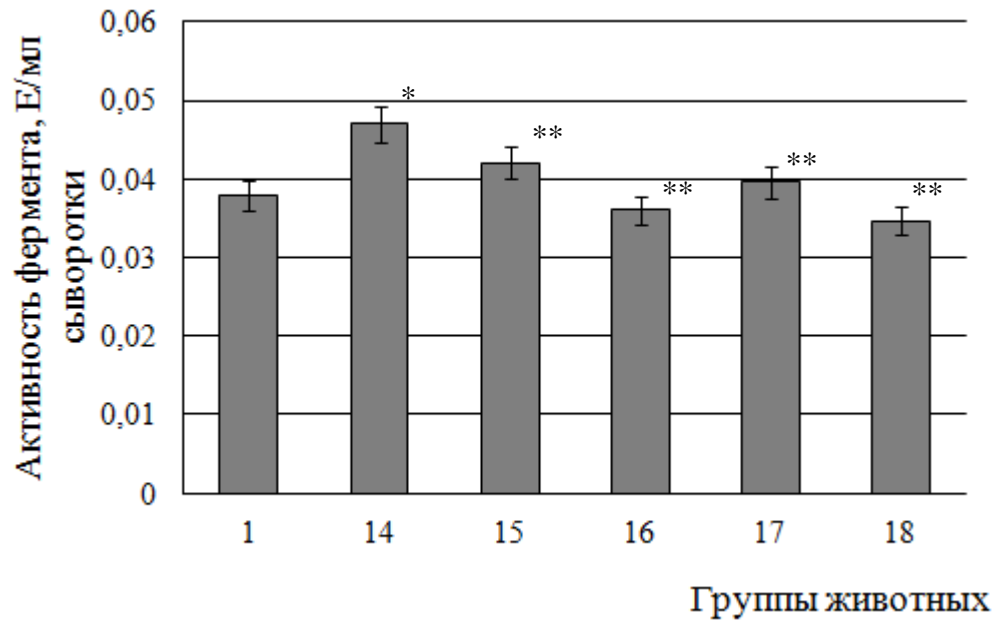


а

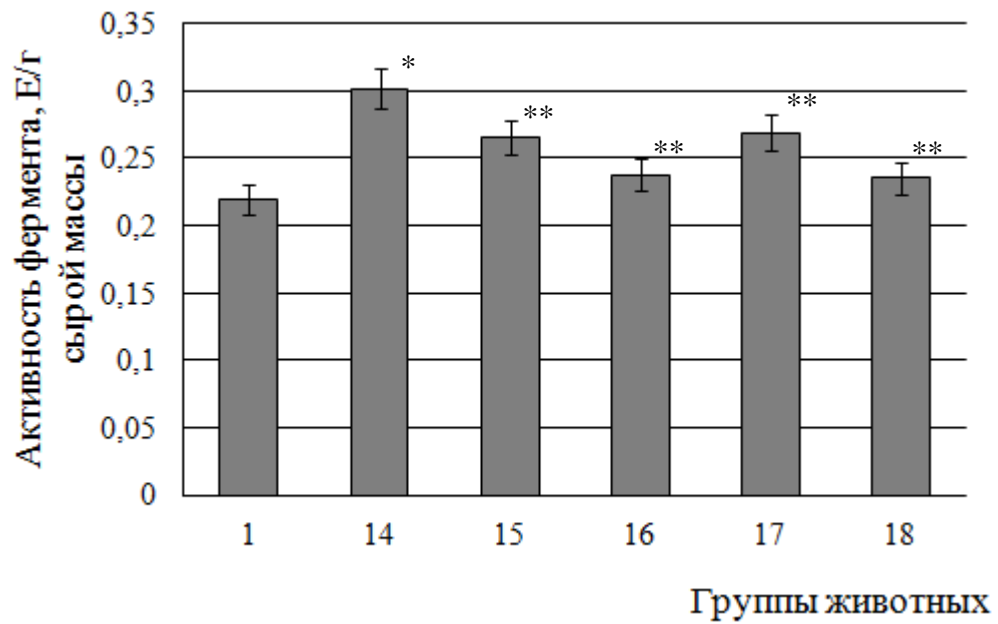


б

Рис. 45. Активность глутатионредуктазы, выраженная в Е/мг белка, в сыворотке крови (а) и мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 21,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)



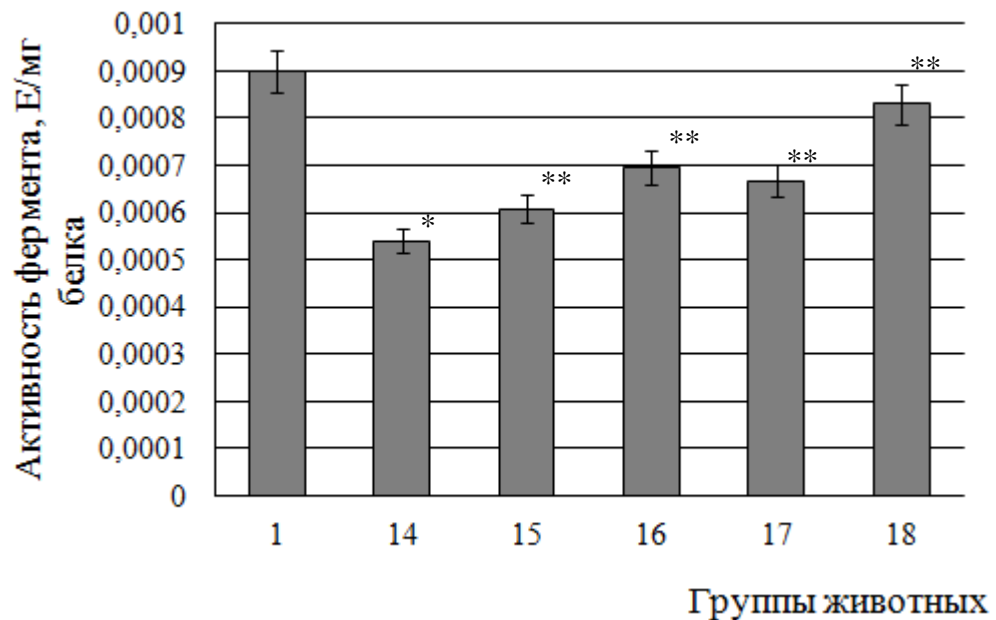
а



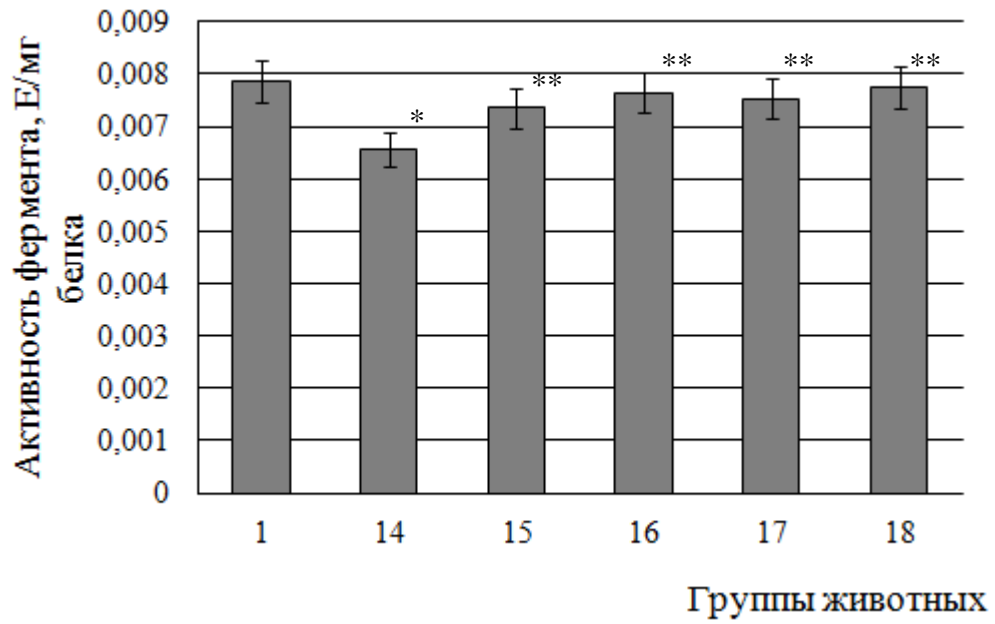
б

Рис. 46. Активность глутатионредуктазы, выраженная в Е/мл, в сыворотке крови (а) и в Е/г сырой массы в мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)

Введение крысам с экспериментальным РА эпифамина в дозе 1,2 мг/кг способствовало возрастанию удельной активности ГТ, сниженной в условиях патологии, в сыворотке крови и мышцах на 12%, в дозе 2,5 мг/кг – на 29% и 16% соответственно. При действии мелаксена в дозе 5,0 и 10 мг/кг на фоне патологии активность фермента увеличивалась на 24% и 54% в сыворотке крови и на 15% и 18% в мышцах (рис. 47). Вероятно, возрастание активности указанного фермента вызвано увеличением концентрации GSH при введении исследуемых веществ.

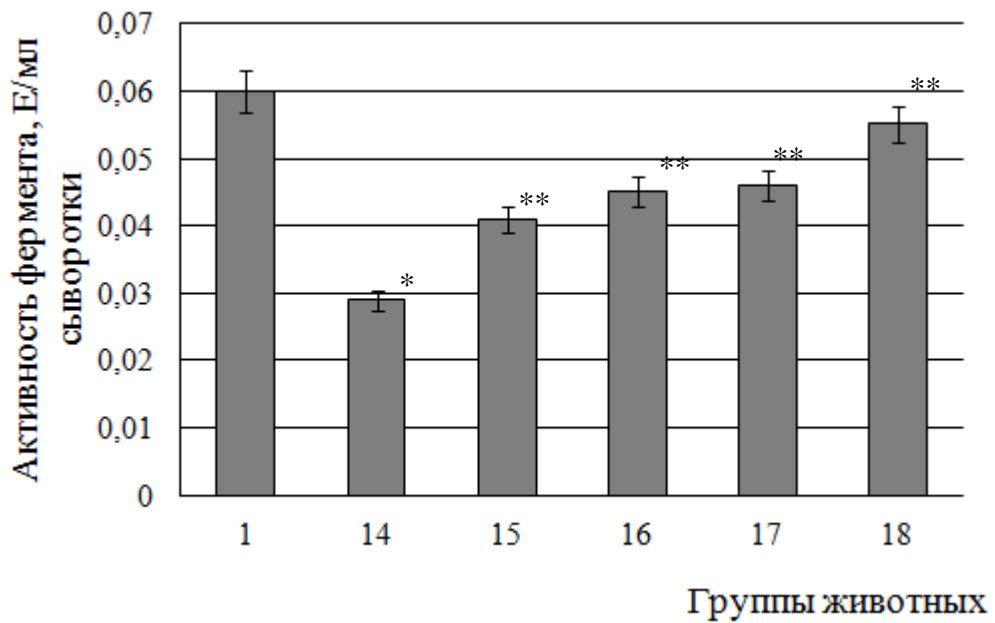


а

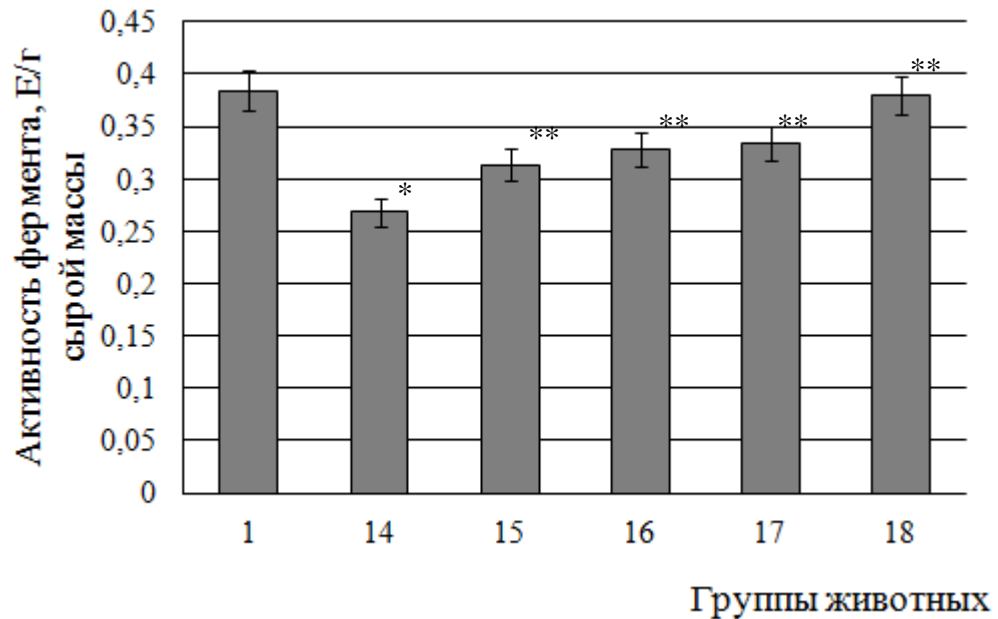


б

Рис. 47. Активность глутатионтрансферазы, выраженная в E/мг белка, в сыворотке крови (а) и мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)



а

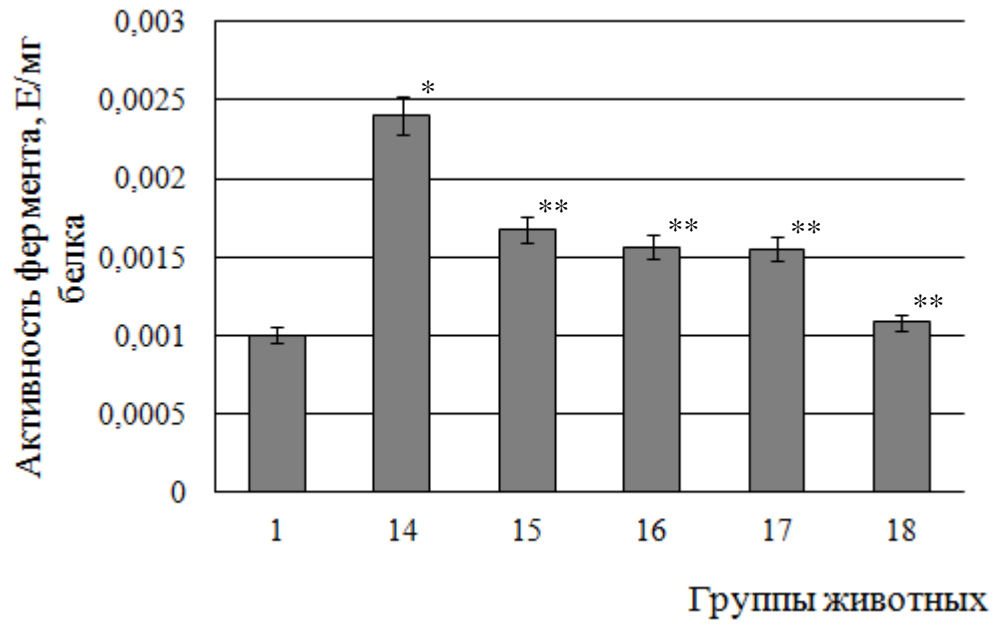


б

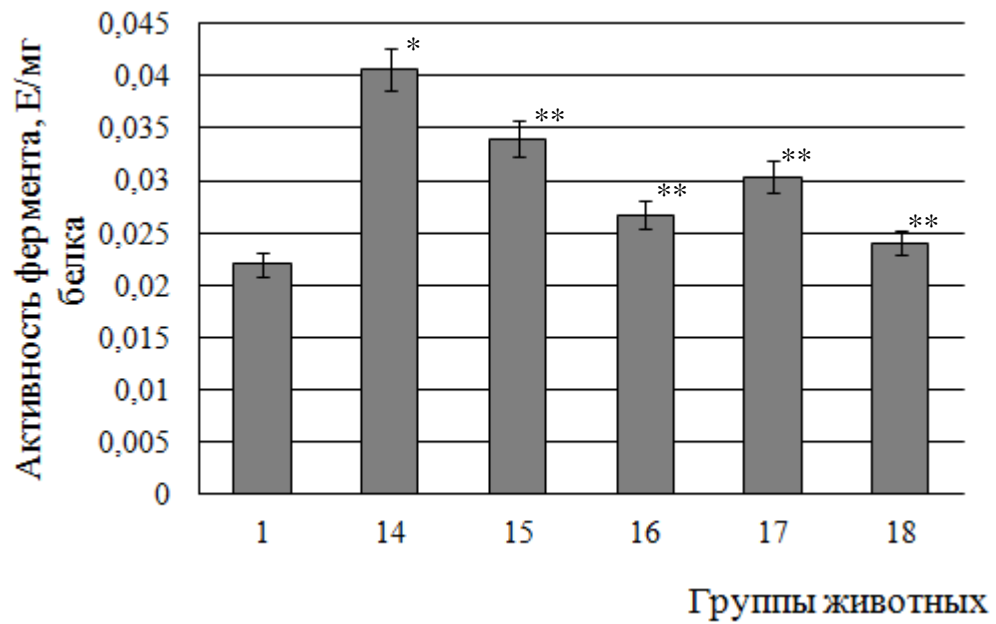
Рис. 48. Активность глутатионтрансферазы, выраженная в Е/мл, в сыворотке крови (а) и в Е/г сырой массы в мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)

4.3.3. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на активность НАДФН-генерирующих ферментов в тканях экспериментальных животных с экспериментальным ревматоидным артритом

Отмечено, что введение мелатонин-корректирующих препаратов приводило к изменению активности Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ, возрастающей в патологическом состоянии, в сторону контрольных значений. Так, при действии эпифамина в дозе 1,2 мг/кг удельная активность НАДФ-ИДГ снижалась в сыворотке крови и мышцах в 1,4 и 1,2 раза, в дозе 2,5 мг/кг – в 1,5 раза по сравнению с уровнем при патологии. Введение мелаксена в дозе 5,0 и 10 мг/кг крысам с экспериментальным РА снижало активность НАДФ-ИДГ в 1,6 и 2,2 раза в сыворотке крови и в 1,3 и 1,7 раза в мышцах (рис. 49).

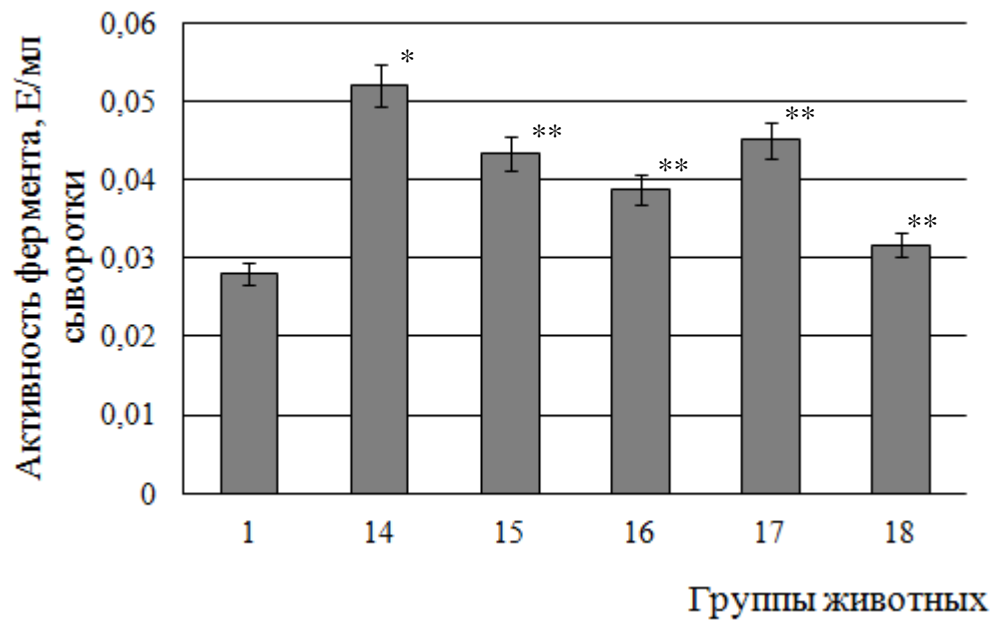


а

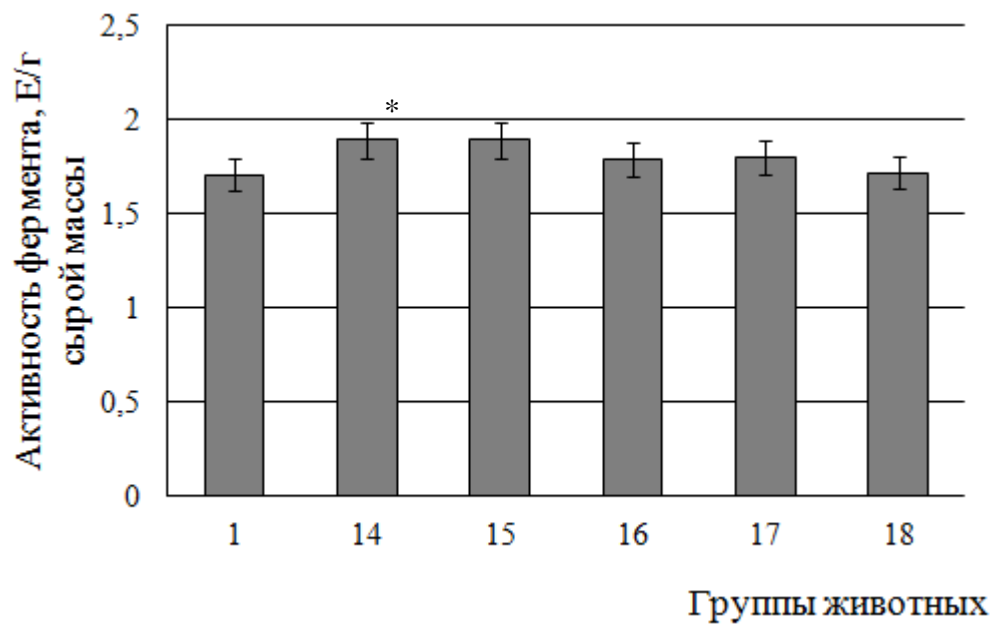


б

Рис. 49. Активность НАДФ-изоцитратдегидрогеназы, выраженная в Е/мг белка, в сыворотке крови (а) и мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)



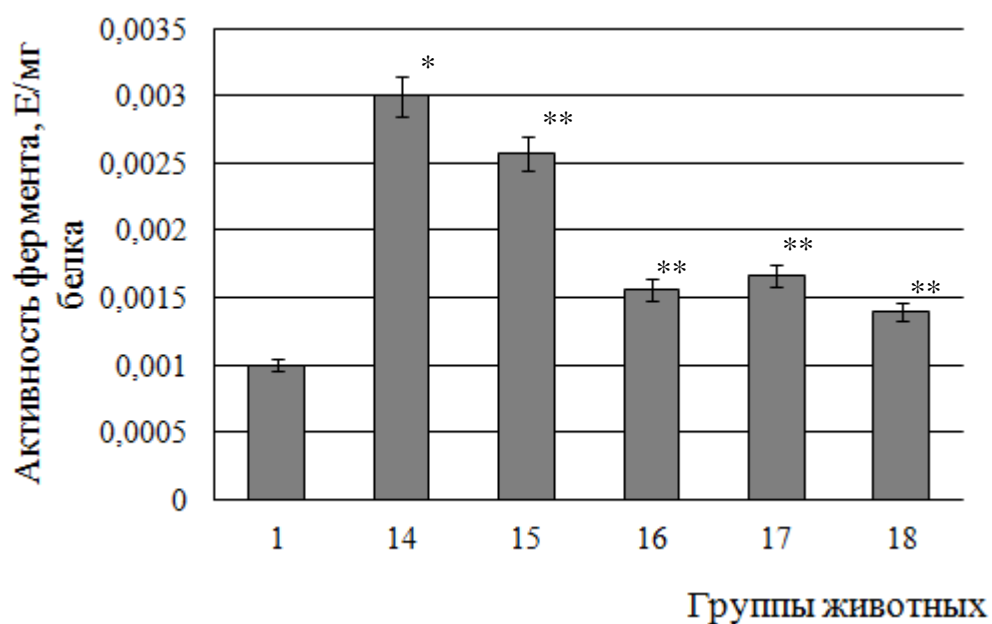
а



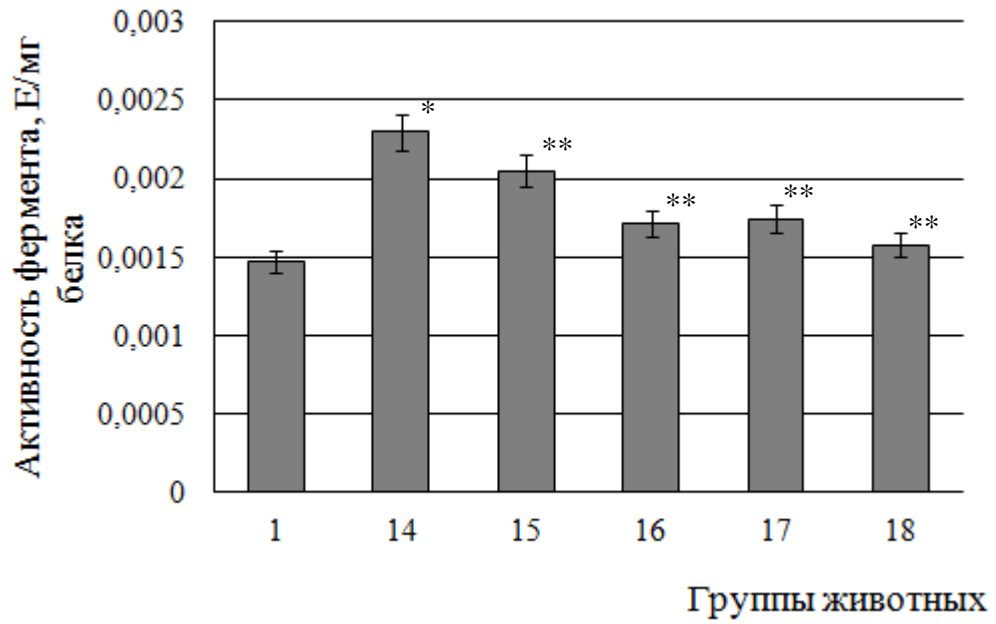
б

Рис. 50. Активность НАДФ-изоцитратдегидрогеназы, выраженная в Е/мл, в сыворотке крови (а) и в Е/г сырой массы в мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)

Введение эпифамина в дозе 1,2 мг/кг животным с патологией приводило к понижению удельной активности ГбФДГ в сыворотке и мышцах на 17% и 12%, в дозе 2,5 мг/кг – на 92% и 34%. Использование мелаксена в дозах 5,0 и 10 мг/кг на фоне развития РА снижало активность исследуемого фермента в 1,8 и 2,1 раза в сыворотке и в 1,3 и 1,5 раза в мышцах. По-видимому, снижение степени мобилизации ГР/ГП АОС, к которому приводит введение эпифамина и мелаксена, способствующее торможению процессов свободнорадикального окисления, проявляется и в уменьшении активности НАДФН-генерирующих ферментов.

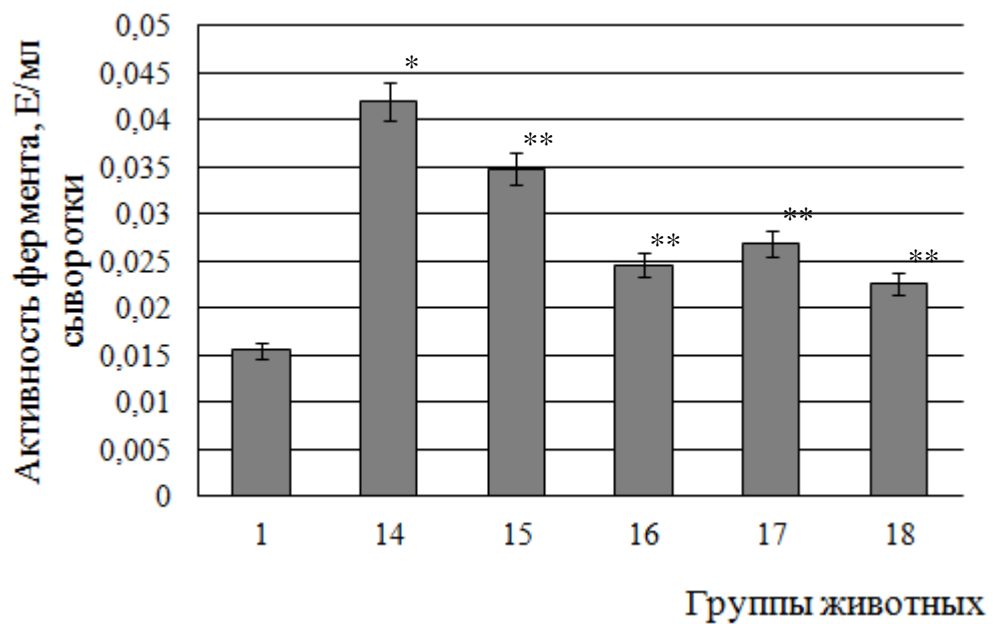


а

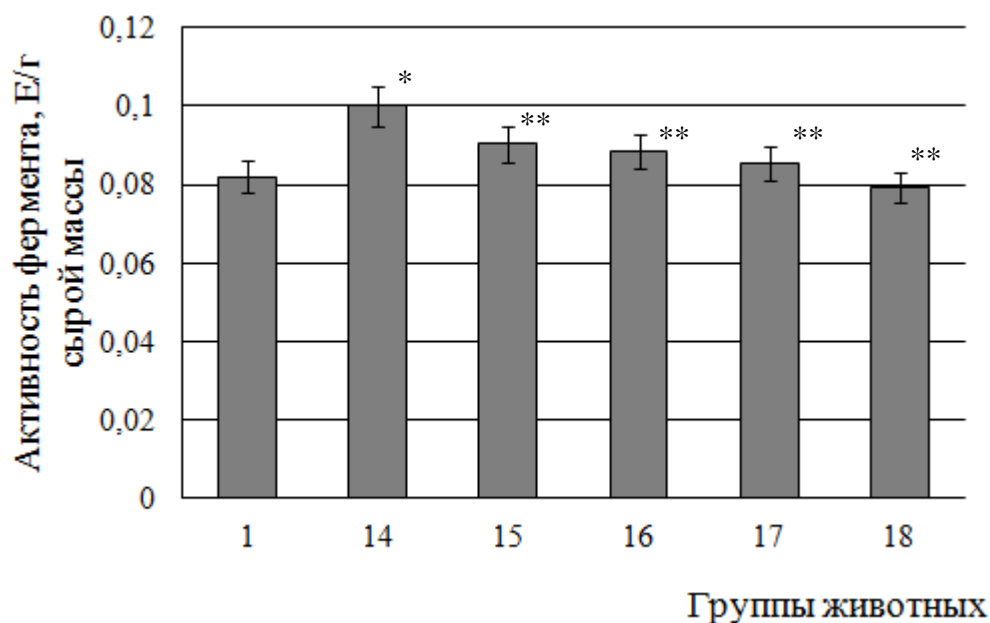


б

Рис. 51. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, выраженная в Е/мг белка, в сыворотке крови (а) и мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)



а



б

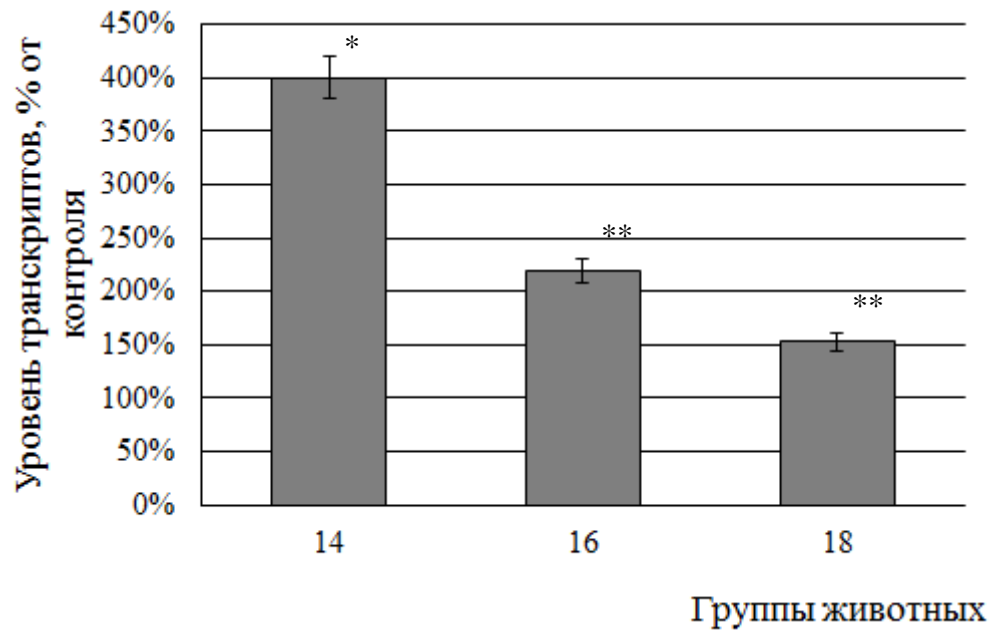
Рис. 52. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, выраженная в Е/мл, в сыворотке крови (а) и в Е/г сырой массы в мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 мг/кг (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 мг/кг (17) и 10 мг/кг (18)

4.3.4. Анализ уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов в тканях крыс с экспериментальным ревматоидным артритом и введении мелатонин-корректирующих препаратов

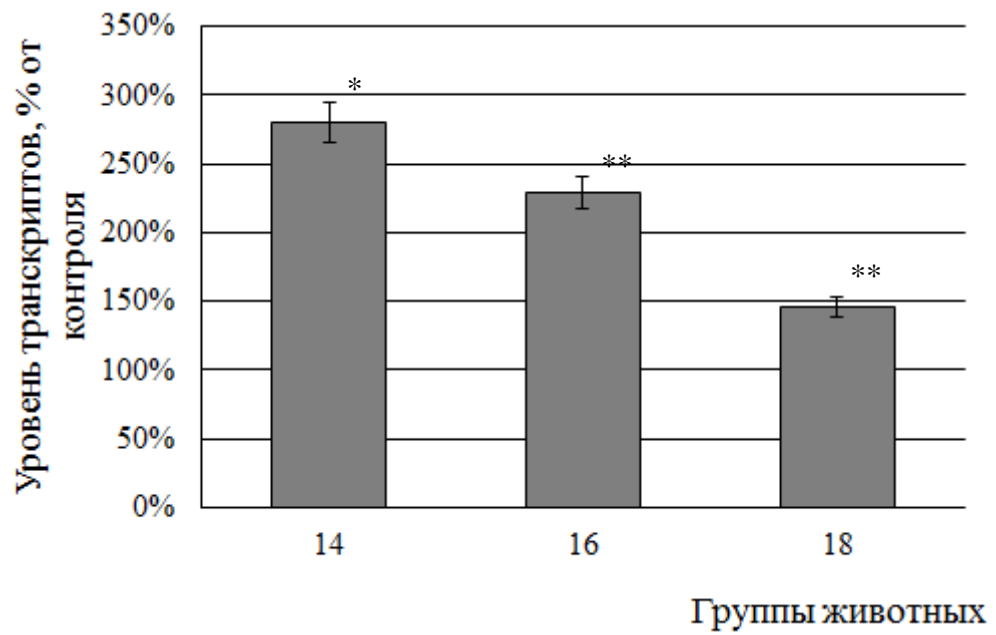
Расчет разницы экспрессии с учетом порогового цикла для GAPDH и значений эффективности амплификации показал, что при введении эпифамина и мелаксена животным с экспериментальным РА происходит снижение уровня транскриптов с генов антиоксидантных ферментов, возрастающего при патологии. Показано, что экспрессия генов *Sod1*, *Cat* и *Gsr* при введении эпифамина в дозе 2,5 мг/кг снижалась в мышцах в 1,2 раза, а гена *Gpx1* – в 1,3 раза по сравнению с животными с РА. При этом в крови уровень транскриптов генов *Sod1*, *Cat*, *Gpx1* и *Gsr* был снижен в 1,8, 1,2, 1,7 и

1,5 раза соответственно. Использование в качестве протектора мелаксена в дозе 10 мг/кг на фоне патологии приводило к уменьшению экспрессии исследуемых генов в крови в 2,6, 1,5, 1,9 и 1,8 раза, в мышцах – в 1,9, 1,3, 1,7 и 1,8 раза соответственно (рис. 53-56). Снижение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов при введении эпифаимина и мелаксена на фоне развития экспериментального РА, вероятно, происходит благодаря коррегированию уровня мелатонина данными препаратами. Обладая выраженным антиоксидантным потенциалом, данный гормон, очевидно, снижает функциональную нагрузку на ферменты АОС. Кроме того, уменьшение степени развития ОС, может способствовать снижению активности транскрипционного фактора NF-κB, который стимулирует транскрипцию генов антиоксидантных ферментов. Таким образом, изменение активности исследуемых ферментов может быть обусловлено снижением их синтеза *de novo*, что не исключает, однако, возможности конформационных изменений в молекуле белков.

В ходе постаmplификационного анализа кривых плавления выявлено наличие одного четкого температурного пика для каждой пробы (рис. 57), что указывает на высокую специфичность праймеров и гомогенность продуктов ПЦР. Это, также, подтверждается результатами проведения электрофореза в агарозном геле (рис. 58).

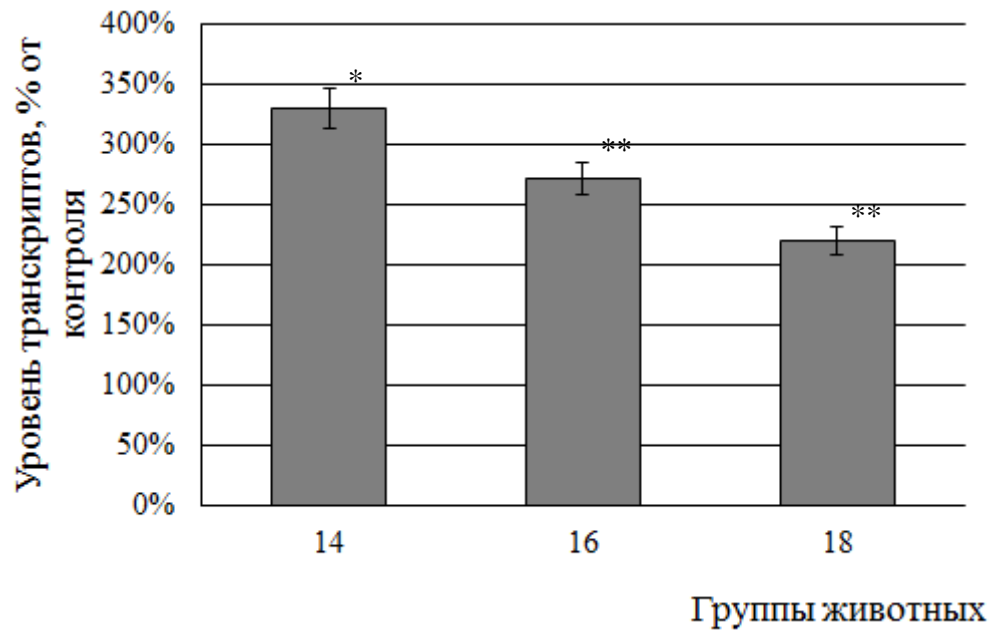


а

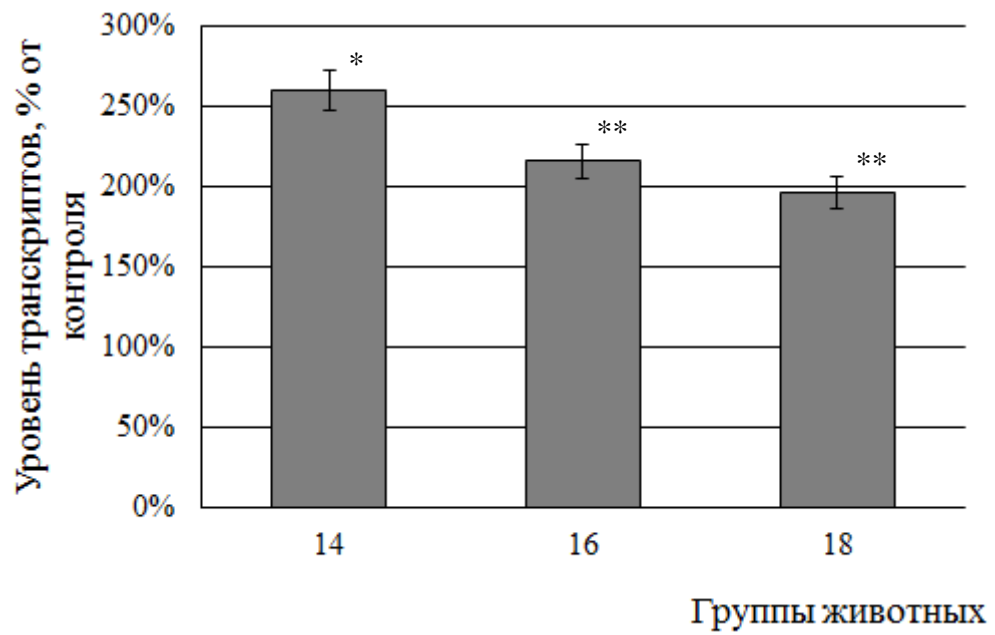


б

Рис. 53. Уровень транскриптов гена Sod1 в крови (а) и мышцах (б) крыс с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина (16) и мелаксена (18)

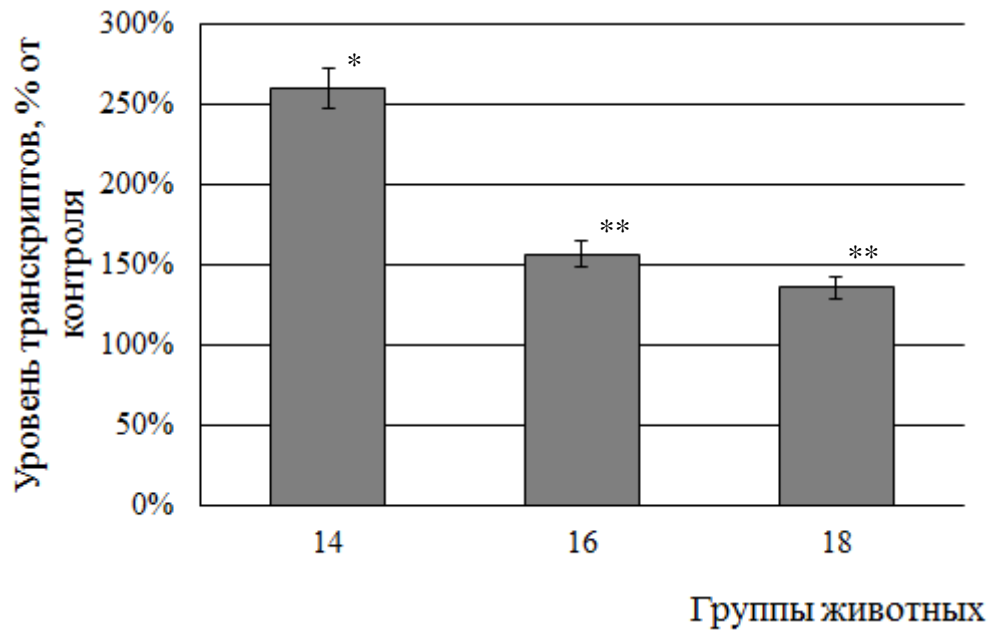


а

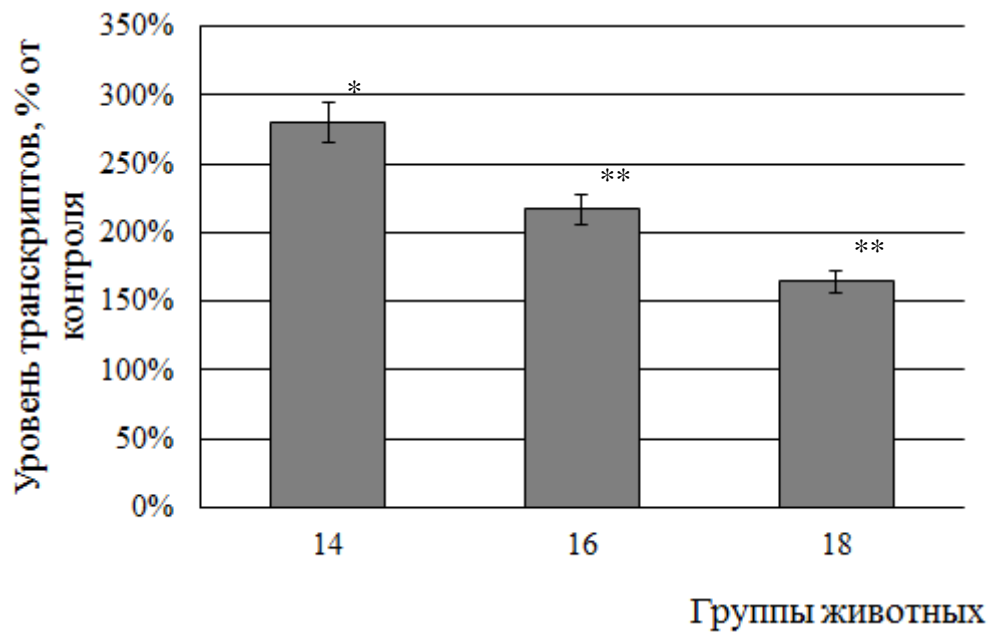


б

Рис. 54. Уровень транскриптов гена *Cat* в крови (а) и мышцах (б) крыс с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина (16) и мелаксена (18)

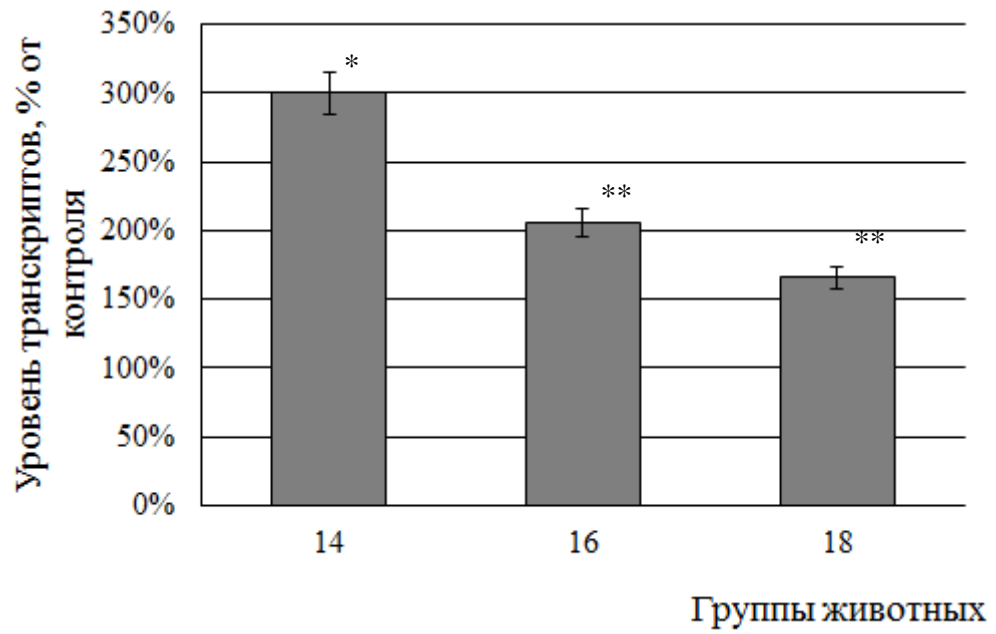


а

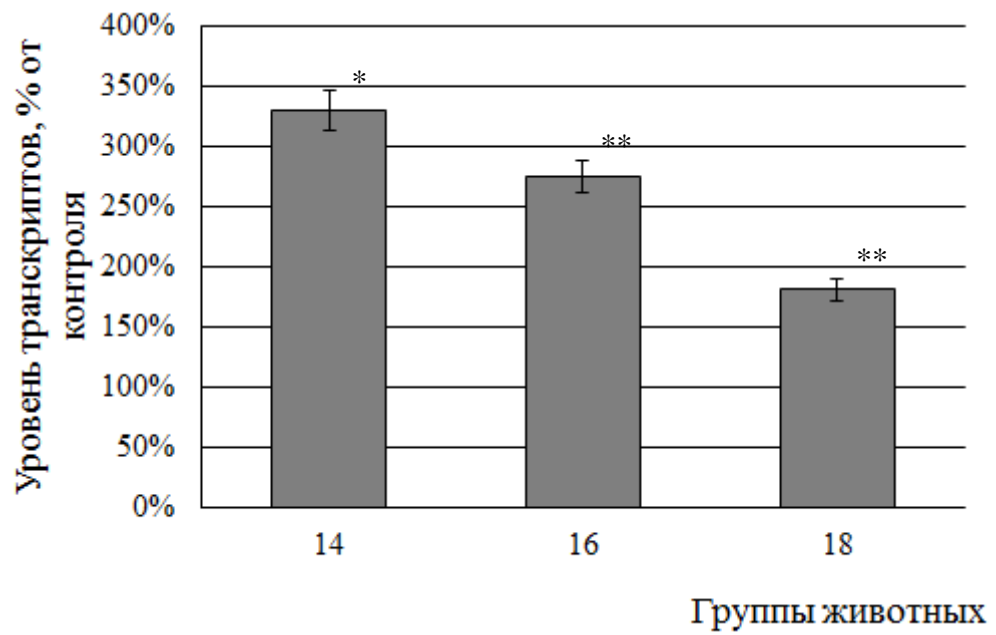


б

Рис. 55. Уровень транскриптов гена Grx1 в крови (а) и мышцах (б) крыс с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина (16) и мелаксена (18)



а



б

Рис. 56. Уровень транскриптов гена Gsg в крови (а) и мышцах (б) крыс с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина (16) и мелаксена (18)

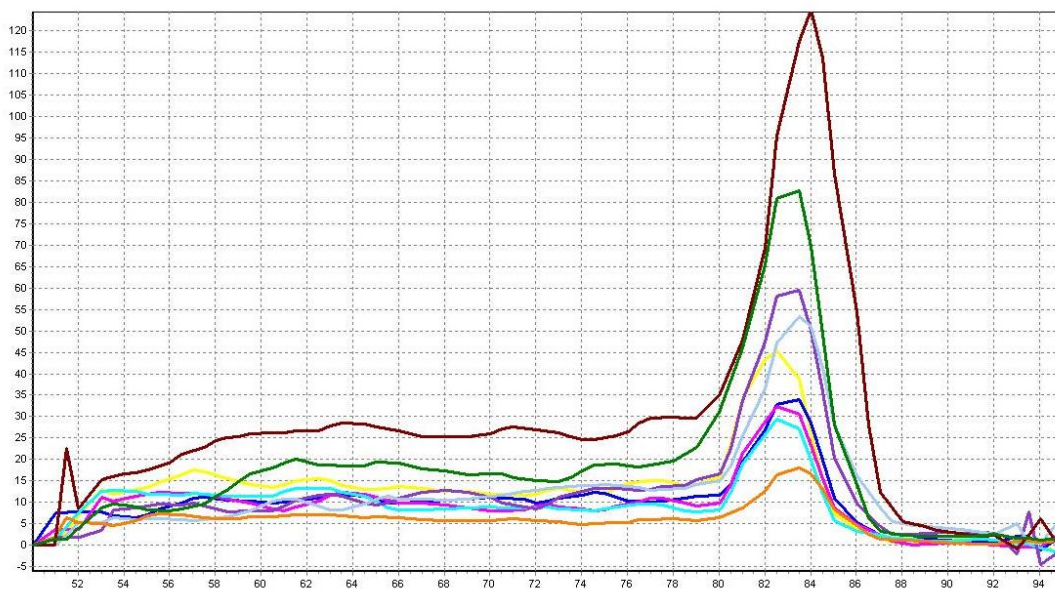


Рис. 57. Кривые плавления продуктов амплификации ПЦР

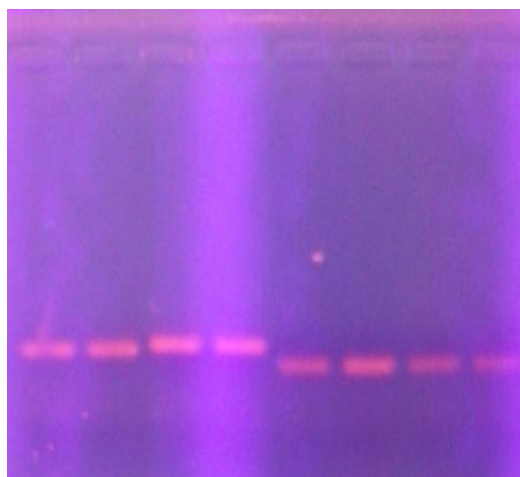


Рис. 58. Электрофереграмма продуктов амплификации ПЦР

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из ключевых факторов развития как СД2, так и РА, а также связанных с ними осложнений, является ОС, сопровождающийся нарушением скорости продукции и утилизации свободных радикалов. Установлено, что при СД2 увеличивается продукция $O_2^{\cdot-}$ митохондриальными клетками [66], ксантинооксидазой, цитохромом P-450, а также путем протеинкиназа C-зависимой активации НАДН/НАДФН-оксидазы [125]. Развитие РА сопровождается колебаниями содержания кислорода в синовиальной жидкости вследствие ишемии-реперфузии, патологического ускорения метаболизма тканей и устойчивой деформации суставов [130]. В ответ на частые изменения парциального давления кислорода, механических нагрузок, содержания иммуномодулирующих и воспалительных медиаторов хондроциты начинают продуцировать повышенный уровень АФК [195, 222, 245]. Это ведет к повреждению структуры и функций биополимеров, результатом чего может явиться гибель клеток.

В ходе проведенного исследования было выявлено, что при введении мелатонин-корректирующих препаратов на фоне развития патологий, сопряженных с развитием ОС – СД2 и РА, происходит снижение показателей, отражающих интенсивность СРП. Так, отмечено уменьшение параметров БХЛ – S и I_{max} , а также уровня ДК в исследуемых тканях экспериментальных животных (рис. 59). Полученные данные свидетельствуют о способности исследуемых веществ снижать уровень ОС.

В условиях развития патологического состояния наблюдалось снижение активности АГ в исследуемых тканях животных, что, вероятно, связано с окислительной модификацией активного центра фермента под действием АФК. На фоне этого отмечено возрастание уровня цитрата. Введение препаратов, корректирующих уровень мелатонина, способствовало росту активности АГ и снижению концентрации цитрата, обусловленному, по-видимому, снижением уровня ОС при действии исследуемых веществ, что

может способствовать регенерации активного центра АГ и метаболизации цитрата в реакции, катализируемой данным ферментом.

Наряду с этим, на фоне введения мелатонин-корректирующих препаратов отмечено изменение активности каспаз и степени фрагментации ДНК. Согласно полученным данным активность ключевых маркеров апоптоза – каспаз-3 и -8 – возрастала при развитии патологических состояний. При введении мелатонин-корректирующих препаратов наблюдалось изменение активности указанных протеаз в сторону контрольных значений. Кроме того, введение протекторов крысам с исследуемыми патологиями способствовало снижению степени фрагментации ДНК в тканях по сравнению с животными с экспериментальными СД2 и РА, у которых при электрофорезе визуализировалась характерная «апоптотическая лестница» (рис. 59). Очевидно, что указанные эффекты исследуемых веществ могут быть свидетельством их антиапоптотического действия.

Установлено, что под воздействием мелатонин-корректирующих препаратов на фоне развития патологий происходила коррекция функционирования компонентов АОС, что, вероятно, связано с проявлением ими антиоксидантных свойств. Это подтверждается снижением тангенса угла падения кинетической кривой – параметра БХЛ, характеризующего общий антиоксидантный потенциал.

Кроме того, при введении мелатонин-корректирующих препаратов животным на фоне развития СД2 и РА, наблюдалось изменение активности СОД и каталазы в исследуемых тканях животных, увеличивающейся при патологии, в сторону контрольных значений, что может быть связано с антиоксидантным действием исследуемых веществ посредством их влияния на метаболизм мелатонина. Показано, что введение эпифамина, мелаксена и вальдоксана при СД2 и РА приводило к возрастанию уровня GSH в исследуемых тканях животных. Наряду с этим, отмечено снижение каталитической активности ГП, ГР и ГТ при введении лекарственных средств

животным с СД2, что может быть сопряжено с торможением скорости СРП в организме животных при использовании протекторов и соответствующем снижении степени мобилизации данных ферментов антиоксидантной защиты. Также, активность ГП и ГР, возрастающая при экспериментальном РА, снижалась при введении эпифамина и мелаксена. При этом активность ГТ, снижающаяся у животных с РА, изменялась в направлении контрольных значений при введении мелатонин-корректирующих препаратов, что, вероятно, обусловлено метаболическими изменениями в тканях крыс на фоне развития аутоиммунного процесса и действия протекторов (рис. 59).

Функционирование глутатионовой АОС сопряжено с постоянным поступлением в систему восстановительных эквивалентов, которое осуществляют ферменты НАДФ-ИДГ и Г6ФДГ. В ходе эксперимента было показано, что введение мелатонин-корректирующих препаратов приводило к снижению активности НАДФ-ИДГ, возрастающей при развитии СД2 и РА, в исследуемых тканях животных. Отмечено, что активность Г6ФДГ снижалась при СД2, что может быть связано с активацией определенных метаболических путей, характерных для данной патологии. Известно, что при СД снижена интенсивность функционирования пентозофосфатного пути [71]. Это, вероятно, связано с подавлением синтеза глюкокиназы и индукцией глюкозо-6-фосфатазы в печени, вследствие чего уменьшается доступность глюкозо-6-фосфата для Г6ФДГ [39]. Введение мелатонин-корректирующих препаратов способствовало изменению активности фермента в сторону контрольных значений. Применение эпифамина и мелаксена на фоне развития экспериментального РА снижало активность Г6ФДГ, возрастающую у животных с патологией. По-видимому, снижение интенсивности функционирования глутатионовой АОС при введении исследуемых веществ, способствующих торможению процессов СО, проявляется и в уменьшении активности НАДФН-генерирующих ферментов.

Использование метода ПЦР в режиме реального времени позволило оценить изменение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов.

Показано, что применение мелатонин-корректирующих препаратов при развитии СД2 и РА приводило к снижению уровня транскриптов генов *Sod1*, *Cat*, *Gpx1* и *Gsr*, возрастающего при данных заболеваниях в исследуемых тканях крыс, что согласуется с результатами определения активности данных ферментов. Известно, что гены СОД, каталазы и ГП имеют в области промотора сайт связывания для редокс-чувствительного транскрипционного ядерного фактора NF-κB [246], который контролирует экспрессию ряда генов, играющих важную роль в ответе на стресс. Кроме того, транскрипция гена ГР находится в зависимости от степени восстановленности транскрипционного фактора ОхуR [38]. Активация данного белка под действием H₂O₂ стимулирует синтез порядка 30 ферментов, в том числе и ГР. Введение исследуемых препаратов снижало интенсивность СРП, что, по-видимому, уменьшало активацию указанных факторов и, как следствие, уровень транскрипции антиоксидантных ферментов. Полученные данные свидетельствуют, что изменение каталитической активности ферментов под действием мелатонин-корректирующих препаратов может быть обусловлено снижением скорости их синтеза.

Таким образом, введение мелатонин-корректирующих препаратов – эпифамина, мелаксена и вальдоксана, при патологиях, сопряженных с развитием ОС – СД2 и РА, оказывает положительное воздействие на свободнорадикальный гомеостаз. Исследуемые вещества, благодаря воздействию на метаболизм мелатонина и его рецепторы, способны снижать интенсивность СРП, что уменьшает функциональную нагрузку на АОС. Кроме того, положительная динамика в изменении маркерных показателей развития СД2 и РА при введении мелатонин-корректирующих препаратов позволяет рассматривать их в качестве потенциальных терапевтических агентов для лечения указанных заболеваний. На основании полученных результатов представлена гипотетическая схема, отражающая участие мелатонин-корректирующих препаратов в регуляции свободнорадикального гомеостаза при ОС, индуцированном развитием СД2 и РА.

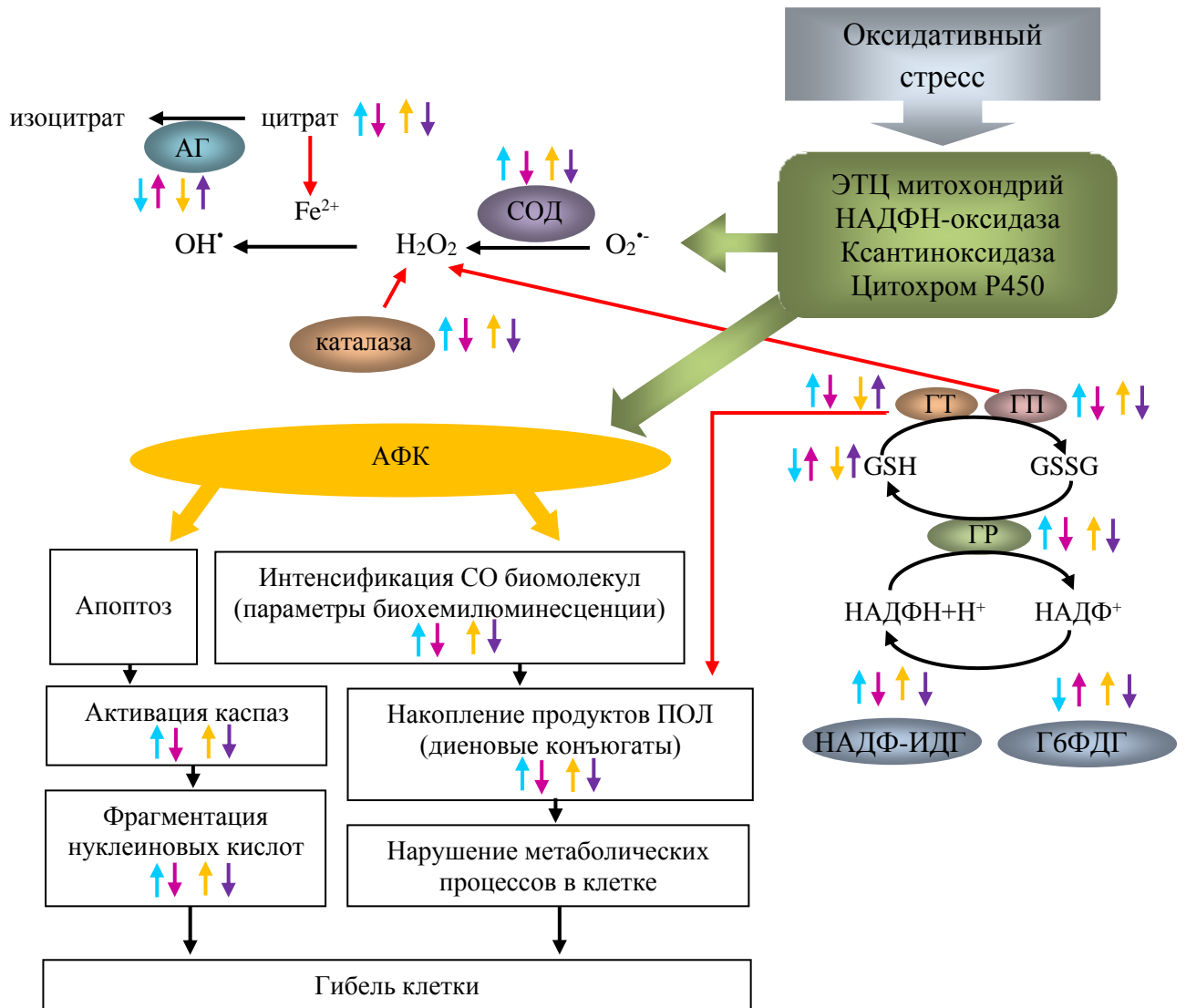


Рис. 59. Гипотетическая схема, отражающая участие мелатонин-корректирующих препаратов в регуляции свободнорадикального гомеостаза при патологиях, сопряженных с развитием окислительного стресса

Условные обозначения: $\downarrow\uparrow$ - изменение параметра при сахарном диабете 2 типа; $\uparrow\downarrow$ - изменение параметра при введении мелатонин-корректирующих препаратов крысам с сахарным диабетом 2 типа; $\uparrow\downarrow$ - изменение параметра при ревматоидном артрите; $\downarrow\uparrow$ - изменение параметра при введении мелатонин-корректирующих препаратов животным на фоне ревматоидного артрита;

ВЫВОДЫ

1. Воздействие эпифамина, мелаксена и вальдоксана при развитии СД2 приводило к снижению концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс, возрастающей при патологии. Отмечено также изменение маркерных показателей РА, увеличивающихся в патологическом состоянии, в направлении контрольных значений. Эти результаты свидетельствуют о способности изучаемых препаратов оказывать протекторное действие при развитии патологий, сопряженных с ОС.

2. Установлено, что исследуемые лекарственные средства обладают выраженным антиоксидантным эффектом, снижая интенсивность свободнорадикального окисления биомолекул в тканях крыс, что подтверждается полученными данными об уменьшении показателей S и I_{\max} хемилюминесценции, а также концентрации ДК, возрастающих при СД2 и РА.

3. Активность каспазы-3 и -8 и степень фрагментации ДНК снижалась под воздействием мелатонин-корректирующих препаратов у животных с индуцируемыми патологиями, что указывает на способность исследуемых веществ оказывать воздействие на интенсивность апоптоза в тканях крыс.

4. Показано, что под влиянием мелатонин-корректирующих препаратов активность антиоксидантных ферментов – СОД, каталазы, ГП, ГР, ГТ – изменялась в сторону показателей, характерных для контрольных крыс. Факт уменьшения степени мобилизации антиоксидантных ферментов по сравнению с СД2 и РА подтверждается также изменением значений $tg\alpha 2$ БХЛ в направлении контрольных значений.

5. При введении эпифамина, мелаксена и вальдоксана животным с СД2 и РА отмечено снижение уровня транскриптов генов, кодирующих СОД1, каталазу, ГП1 и ГР, по сравнению со значениями при патологии.

6. Активность ферментов окислительного метаболизма при введении мелатонин-корректирующих препаратов животным с СД2 и РА, изменяющаяся при патологии, приближалась к контрольным показателям.

7. На основании проведенных исследований предложена гипотетическая схема, отражающая участие мелатонин-корректирующих препаратов в регуляции свободнорадикального гомеостаза при патологиях, сопряженных с развитием ОС.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абрамова Ж.И. Человек и противокислительные вещества / Ж.И. Абрамова, Г.И. Оксенгендлер – Л.: Наука, 1985. – 230 с.
2. Аметов А.С. Сахарный диабет 2 типа / А.С. Аметов // Основы патогенеза и терапии - 2003. - С.80 - 83.
3. Антиоксидантная защита организма при старении и некоторых патологических состояниях с ними связанных / А.А. Подколзин [и др.] // Клиническая геронтология. – 2001. - № 3. – С. 50–58.
4. Арушанян Э.Б. Эпифизарный гормон мелатонин и нарушения познавательной деятельности головного мозга / Э.Б. Арушанян // РМЖ. – 2006. – Т. 14, № 9. – С. 63.
5. Афанасьев В.Г. К микрометоду определения лимонной кислоты в сыворотке крови с помощью фотоэлектроколориметра / В.Г. Афанасьев, В.С. Зайцев, Т.И. Вольфсон // Лаб. дело. – 1973. – №4. – С. 115-116.
6. Балаболкин М.И. Лечение сахарного диабета и его осложнений. Руководство для врачей / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова, В.М. Креминская. – М: Медицина, 2005. – 512 с.
7. Балаболкин М.И. Применение убихинона (коэнзима Q) в терапии сахарного диабета и его сосудистых осложнений / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова, В.М. Креминская // Сахарный диабет. – 2007. – Т. 4. – С. 37-42.
8. Балаболкин М.И. Роль инсулинорезистентности в патогенезе сахарного диабета 2 типа / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова // Тер. архив. – 2003. - № 1. – С. 72-77.
9. Балаболкин М.И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова // Проблемы эндокринологии. – 2000. - № 6. – С. 29 – 34.
10. Богомоллов А.Ф. Методические рекомендации по курсу экспериментальной физиологии для студентов биологического отделения биолого-

- имического факультета / А.Ф. Богомолов, И.Ю. Лукьянов, Л.Р. Горбачева. – Иваново: Ивановский государственный университет, 2005. – 43 с.
11. Божанская В.В. Осложнения инсулиннезависимого сахарного диабета / В.В. Божанская, Л.Г. Старикова // Вестник новых медицинских технологий. – 1999. - № 2. – С. 68-74.
 12. Брюханов В.М. Диабетогенное действие диуретиков / В.М.Брюханов, Я.Ф. Зверев // Нефрология. - 2000. - №1. - С.17 - 27.
 13. Бузлама В.С. Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма у животных / В. С. Бузлама. – Воронеж.: РАСХН, 1997. – 35 с.
 14. Вершинин В.И. Аналитическая химия / В.И. Вершинин, И.В. Власова, И.А. Никифорова. – М.: Академия, 2011. – 444 с.
 15. Влияние мелатонина на активность ферментов антиоксидантной защиты и пентозофосфатный путь при диабете / Е.Ю. Судникович [и др.] // Известия Национальной академии наук Беларуси. Сер. медицинских наук. - Минск: Беларуская навука, 2009. - № 3. - С. 59-62.
 16. Воздействие липоевой кислоты на активность каспаз, показатели иммунного и антиоксидантного статуса при ревматоидном артрите у крыс / Крыльский Е.Д. [и др.] // Биоорганическая химия. – 2016. – Т. 42, № 4. – Р. 431-439.
 17. Глинкина И.И. Диабетический кетоацидоз и диабетическая кома / И.И. Глинкина, А. Зилов // Врач. – 2004. - № 3. – С. 40-42.
 18. Дедов И.И. Государственный регистр сахарного диабета в Российской Федерации: статус 2014 г. и перспективы развития / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, О.К. Викулова // Сахарный диабет. – 2015. – Т.18, №3. – С. 5-23.
 19. Дубинина Е.Е. Биологическая роль супероксидного анионрадикала и супероксиддисмутазы в тканях организма / Е.Е. Дубинина // Успехи современной биологии. – 1989. – Т.108, №1. – С.3-12.

20. Занозина О. В., Боровков Н. Н., Щербатюк Т. Г. Свободно-радикальное окисление при сахарном диабете 2-го типа: источники образования, составляющие, патогенетические механизмы токсичности //Современные технологии в медицине. – 2010. – №. 3.
21. Интенсивность свободнорадикальных процессов и регуляция активности и цитоплазматической NADP-изоцитратдегидрогеназы в кардиомиоцитах крысы в норме и при ишемии / Л.В. Медведева [и др.] // Биохимия. – 2002. – Т. 67, № 6. – С. 838-849.
22. Коагуляционные признаки эндотелиального стресса у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией / Н.В. Аминаева [и др.] // Пробл. эндокринол. – 2002. - № 4. – С. 27-30.
23. Козлов С.Г. Лечение дислипидемий у больных сахарным диабетом 2 типа / С.Г. Козлов, А.А. Лякишев // Клинич. фармакология и терапия. – 2002. - № 11. – С. 25-31.
24. Колесниченко Л.С. Глутатионтрансферазы / Л.С. Колесниченко, В.И. Кулинский //Успехи соврем. биол. – 1989. – Т. 107. – №. 2. – С. 179-194.
25. Крыльский Е.Д. Воздействие тиоктовой кислоты на оксидативный статус тканей крыс при ревматоидном артрите / Е.Д. Крыльский, Т.Н. Попова, Е.М. Кирилова // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49, № 9. – С. 8-11.
26. Кузник Б.И. Цитомедины: 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований / Б.И.Кузник, В.Г.Морозов, В.Х. Хавинсон. – Санкт-Петербург: Наука, 1998. – 310 с.
27. Кухтина Е.Н. Влияние железа, цинка, меди на процессы перекисного окисления липидов / Е.Н. Кухтина, Н.Н. Глущенко // Биохимия. – 1996. – Т. 61, № 6. – С. 993-997.
28. Ланкин В.З. Особенности модификации липопротеинов низкой плотности в развитии атеросклероза и сахарного диабета типа 2 / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Е.М. Кумскова // Кардиологический вестник. – 2008. – Т. 3, № 1. – С. 60-67.

29. Ллойд Э. Справочник по прикладной статистике / Э. Ллойд, У. Ледерман. – М.: Финансы и статистика, 1990. – 525 с.
30. Луговская С.А. Лабораторная гематология / С.А. Луговская, В.В. Долгов. – Тверь: Триада, 2006. – 158 с.
31. Матюшин Б.Н. Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении / Б.Н. Матюшин, А.С.Логинов, В.Д. Ткачев // Лаб. дело. – 1991. – № 7. – С. 16-19.
32. Мендель В.Э. Опыт применения препарата Мелаксен в российской медицинской практике / В.Э. Мендель, О.И. Мендель // Медицинский научно-практический журнал “Лечащий Врач”. - 2010. - Т. 2, №6. – С. 336.
33. Меншикова В.В. Справочник Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меншикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
34. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк [и др.] // Лаб.дело. – 1988. – №. 1. – С. 16-19.
35. Михайлов В. В. Основы патологической физиологии: Руководство для врачей. / В.В. Михайлов, Б. М. Сагалович - М: Медицина, 2001. – 704 с.
36. Нарушения иммунологических показателей у больных с синдромом инсулинорезистентности / В.А. Алмазов [и др.] // Кардиология. - 2001. - №8. - С.54 - 58.
37. Насонов Е.Л. Почему необходима ранняя диагностика и лечение ревматоидного артрита?/ Е.Л. Насонов // РМЖ. – 2002. – Т. 10, № 22. – С. 1009–1012.
38. Николайчик Е.А. Регуляция метаболизма клетки / Е.А. Николайчик. – Минск: БГУ, 2007. – 165 с.
39. Патологическая физиология / Под ред. А.Д. Адо и Л.М. Ишимовой. - М.: Медицина, 1980. – 520 с.
40. Свободнорадикальные процессы и антиоксидантная система в реализации восстановительной функции сна / А.А. Нехороший [и др.] // Физиология человека. – 2009. – Т. 35, № 4. – С. 71-75.

41. Современные представления об антиоксидантной роли глутатиона и глутатионзависимых ферментов / Е.В. Калинина [и др.] // Вестник Российской АМН. - 2010. - №3. - С.56-64.
42. Соловьева Д.В. Применение тималина и эпیتالаміна для коррекции в возрастных нарушений гомеостаза у женщин / Д.В. Соловьева, В.Х. Хавинсон // Клинич. геронтология. – 2000. – Т. 6, № 7-8.– С. 106.
43. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1972. – С. 63-64.
44. Ульянов А.М. Инсулярная система животных при хроническом дефиците гепарина / А.М. Ульянов, Ю.А. Тарасов // Вопросы медицинской химии. – Т. 46, № 2. – 2000. – С. 149-154.
45. Яфасов К.М. Дислипидемия при сахарном диабете 2 типа: патогенез и лечение / К.М. Яфасов, Н.В. Дубянская // Кардиология. – 2001. - № 9. – С. 74-77.
46. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress / R.J. Reiter [et al.] // J. Biomed. Sci. – 2000. – V.7, №6. – P. 444-458.
47. Activity of four allelic forms of glutathione S-transferase hGSTP1-1 for diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons / X. Hu [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1997. – V. 238. – P 397–402.
48. Aebi H. Catalase in vitro / H. Aebi // Methods in Enzymology. – 1984. – V. 105. – P. 121-126.
49. Akmalі M. Pre- and post-treatment of streptozocin administered rats with melatonin: effects on some hepatic enzymes of carbohydrate metabolism / M. Akmalі, R. Ahmadi, M. Vessal // Arch. Iran Med. – 2010. – V. 13, №2. – P. 105 – 110.
50. Androgen-dependent messenger RNA(s) related to secretory proteins in the mouse epididymis / N.B. Ghyselinck [et al.] // J. Reprod. Fertil. – 1989. – V. 85. – P. 631–639.

51. Anisimov V.N. Effects of exogenous melatonin – a review / V.N. Anisimov // *Toxicol. Pathol.* – 2003. – V. 31, № 6. – P. 589–603.
52. Anisimov V.N. Melatonin and colon carcinogenesis. I. Inhibitory effect of melatonin on development of intestinal tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats / V.N. Anisimov, I.G. Popovich, M.A. Zabezhinski // *Carcinogenesis.* – 1997. – V. 18, № 8. – P. 1549–1553.
53. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain / R. Kohen [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – V. 85. – P. 3175–3179.
54. Arendt J. Melatonin and human rhythms / J. Arendt // *Chronobiol Int.* – 2006. – V. 23, № 1-2. – P. 21–37.
55. Arnao M.B. The physiological function of melatonin in plants / M.B. Arnao, J. Hernandez-Ruiz // *Plant Signal Behav.* – 2006. – V. 1, № 3. – P. 89–95.
56. Atmaca G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids / G. Atmaca // *Yonsei. Med. J.* – 2004. – V. 45, № 5. – P. 776-788.
57. Aydogan S. Melatonin and nitric oxide / S. Aydogan, M.B. Yerer, A. Goktas // *J. Endocrinol. Invest.* – 2006. – V. 29, № 3. – P. 281-287.
58. Baynes J. Role of oxidative stress in development of complication in diabetes / J. Baynes // *Diabetes.* – 2000. – V.40, №4. – P. 405-412.
59. Baynes J.W. Role of oxidative stress in diabetic complications. A new perspective from an old paradigm / J.W. Baynes, J.W. Thorpe // *Diabetes.* – 1999. – V. 48. – P. 1-9.
60. Becker B.F. Towards the physiological function of uric acid / B.F. Becker // *Free Radic Biol Med.* – 1993. – V. 14, №6. – P. 615-631.
61. Benitez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease / G. Benitez-King // *J. Pineal Res.* – 2006. – V. 40, № 1. – P. 1–9.
62. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species / R.J. Reiter [et al.] // *Cell Biochem. Biophys.* – 2001. – V. 34, № 2. – P. 237-256.

63. Blask D.E. Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal / D.E. Blask, R.T. Dauchy, L.A. Sauer // *Endocrine*. – 2005. – V. 27, № 2. – P. 179–188.
64. Board P.G. Identification of cDNAs encoding two human Alpha class glutathione transferases (GSTA3 and GSTA4) and the heterologous expression of GSTA4-4 / P.G. Board // *Biochem J*. – 1998. – V. 330. – P. 827–831.
65. Bourin M. Antidepressant-like activity of S 20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors / M. Bourin, E. Mocaer, R. Porsolt // *J Psychiatry Neurosci*. – 2004. – V. 29, № 2. – P. 126–133.
66. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications / M. Brownlee // *Nature*. – 2001. – V. 414, № 6865. – P. 813-820.
67. Bryant N.J. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4 / N.J. Bryant, R. Govers, D.E. James // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2002. – V. 3. – P. 267-277.
68. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship / M. Macias [et al.] // *Euro. J. Biochem*. – 2003. – V. 270. – P. 832–840.
69. Carruthers A. Facilitated diffusion of glucose / A. Carruthers // *Physiol. Rev*. – 1990. – V.70. – P. 1135-1176.
70. Catalytic cycle of human glutathione reductase near 1 Å resolution / D.S. Berkholz [et al.] // *J. Mol. Biol*. – 2008. – V. 382, № 2. – P. 371-384.
71. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes / S.V. McLennan [et al.] // *Diabetes*. – 1991. – V. 40. – P. 344-348.
72. Characterization of mammalian selenoproteomes / G.V. Kryukov [et al.] // *Science*. – 2003. – V. 300. – P. 1439–1443.
73. Chuang J.I. Melatonin decreases brain serotonin release, arterial pressure and heart rate in rats / J.I. Chuang, S.S. Chen, M.T. Lin // *Pharmacology*. – 1993. – V. 47, № 2. – P. 91–97.

74. Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary β -carotene and cholesterol / A. Van Bennekum [et al.] // *Biochemistry*. – 2005. – V. 44. – P. 4517–4525.
75. Clinical trials of controlled-release melatonin in children with sleep-wake cycle disorders / J.E. Jan [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2000. – V. 29. – P. 34–39.
76. Colwell J.A. Treatment for the procoagulant state in type 2 diabetes / Colwell J.A. // *Endocrinology and Metabolism Clinics*. – 2001. – V. 30, № 4. – P. 207-216.
77. Concordance for Type 1 (insulin-dependent) and Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland / J. Kaprio [et al.] // *Diabetologia*. – 1992. – V. 35, № 11. – P. 1060–1067.
78. Concordance for type 2 (non-insulindependent) diabetes mellitus in male twins / B. Newman [et al.] // *Diabetologia*. – 1987. – V. 30, № 10. – P. 763–768.
79. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin / S. Lund [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1995. – V. 92, № 13. – P. 5817–5821.
80. Contribution of myo-inositol and melatonin to human reproduction / G. Carlomagno [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2011. – V. 159, № 2. – P. 267–272.
81. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells / J.D. Crapo [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. – V. 89. – P. 10405- 10409.
82. Cu, Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells / G.-A. Keller [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1991. – V. 88. – P. 7381–7385.
83. Cytochrome P450 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes / G. Facciola [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2001. – V. 56, № 12. P. 881-888.

84. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels / D.D. Rasmussen [et al.] // *Endocrinology*. – 1999. – V. 140. – P. 1009–1012.
85. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat / T. Wolden-Hanson [et al.] // *Endocrinology*. – 2000. – V. 141. – P. 487–497.
86. Daily rhythm in human urinary melatonin / H.J. Lynch [et al.] // *Science*. – 1975. – V. 187. – P. 169-171.
87. Dear T.N. Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins / T.N. Dear, K. Campbell, T.H. Rabbitts // *Biochemistry*. – 1991. – V. 30, № 43. – P. 10376–10382.
88. del Rincon I. Atherosclerotic cardiovascular disease in rheumatoid arthritis / I. del Rincon, A. Escalante // *Curr. Rheumatol. Rep.* – 2003. – V. 5. – P. 278-286.
89. Detection of protein and mRNA of various components of the NADPH oxidase complex in an immortalized human chondrocyte line / P.J. Moulton [et al.] // *Br. J. Rheumatol.* – 1997. – V. 36. – P. 522–529.
90. Detection of tumor necrosis factor but not tumor necrosis factor in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum / T. Saxne [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 1988. – V. 31. – P. 1041–1045.
91. Differential growth inhibitory effect of melatonin on two endometrial cancer cell lines / Y. Kanishi [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2000. – V. 28. P. 227–233.
92. Distinct promoters determine alternative transcription of GPx-4 into phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase variants / M. Maiorino [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2003. – V. 278. – P. 34286–34290.
93. Distribution of Cu/Zn superoxide dismutase in rat liver / W. Liou [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 1993. – V. 14. – P. 201–207.
94. Diversity of glutathione peroxidases / F. Ursini [et al.] // *Methods Enzymol.* – 1995. – V. 252. – P. 38–53.

95. Donnes recentes sur metabolisme du fer: un etat de transition / E. Cadet [et al.] // *La revue de medecine interne.* – 2005. – V. 26. – P. 315-324.
96. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via Gi2, Gi3, and Gq/11 proteins / L. Brydon [et al.] // *Mol. Endocrinol.* – 1999. – V. 13, № 12. – P. 2025–2038.
97. Dubocovich M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals / M. Dubocovich, M. Markowska // *Endocrine.* – 2005. – V. 27, № 2. – P. 101–110.
98. Dym O. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins / O. Dym, D. Eisenberg // *Protein Sci.* – 2001. – V. 10, № 9. – P. 1712–1728.
99. Early melatonin supplementation alleviates oxidative stress in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease / Z. Feng [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2006. – V. 40, № 1. – P. 101-109.
100. Effect of pinealectomy on liver insulin and glucagon receptor concentrations in the rat / V. Rodríguez [et al.] // *J. Pineal Res.* – 1989. – V. 6, №1. – P. 77-88.
101. Enzymatic determination of membrane lipid peroxidation / M. Maiorino [et al.] // *J. Free Radic. Biol. Med.* – 1985. – V. 1. – P. 203–207.
102. Epp O. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution / O. Epp, R. Ladenstein, A. Wendel // *Eur J Biochem.* – 1983. – V. 133, №1. – P. 51–69.
103. Evidence for oxidised low density lipoprotein in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients / L. Dai [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2000. – V. 32, № 6. – P. 479-486.
104. Explaining how ‘high-grade’ systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis / N. Sattar [et al.] // *Circulation.* – 2003. – V. 108. – P. 2957-2963.
105. Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation / D.K. St. Clair // *Free Radic. Biol. Med.* – 1994. – V. 16. – P. 275–282.

106. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system / A. Carrillo-Vico // *Cell Mol Life Sci.* – 2003. – V. 60, № 10. – P. 2272–2278.
107. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis / S. Hajizadeh [et al.] // *Arthritis Res. Ther.* – 2003. – V. 5, № 5. – P. R234-R240.
108. Fang Y.Z. Free radicals, antioxidants, and nutrition / Y.Z. Fang, S. Yang, G. Wu // *Nutrition.* – 2002. – V. 18, № 10. – P. 872–879.
109. Flohé L. The selenoprotein glutathione peroxidase / L. Flohé // *Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects.* – 1989. – V. 3. – P. 643-731.
110. Frova C.C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives / C.C. Frova // *Biochem. Engineering.* – 2006. – V. 23, № 4. – P. 149-169.
111. Fung B.K. Transducin: structure, function, and role in phototransduction / B.K. Fung // *Progress in retinal research.* – 1986. – V. 6. – P. 151-177.
112. Galano A. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination / A. Galano, D.X. Tan, R.J.Reiter // *J. Pineal Res.* – 2011. - V 51. – P. 1–16.
113. Gamma -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention / Q. Jiang [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2001. – V. 74, № 6. – P. 714-722.
114. Gardner P.R. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs / P.R. Gardner, D.M. Nguyen, C.W. White // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1994. – V. 91, № 25. – P. 12248 - 12252.
115. Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization / F. Morel [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279, № 16. – P. 16246-16253.
116. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter / M. Uldry [et al.] // *FEBS Lett.* – 2002. – V. 524, № 1-3. – P. 199-203.

117. Glutathione antioxidant system in patients with Diabetes Mellitus / L. Kolesnichenko [et al.] // *J. Clin. Lipidol.* – 2008. – V. 2, 5S. – P. 124-125.
118. Glutathionylation regulates cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase activity / S.W. Shin [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2009. – V. 43, № 4. – P. 409-416.
119. Glycation-induced inactivation of NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase: implications for diabetes and aging / I.S. Kil [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2004. – V. 37, № 11. – P. 1765-1778.
120. Gould G.W. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression / G.W. Gould, G.D. Holman // *Biochem J.* – 1993. – V. 295. – P. 329–341.
121. Grace M.S. Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution / M.S. Grace, G.M. Cahill, J.C. Besharse // *Brain Res.* – 1991. – V. 559. – P. 56–63.
122. Griffith O.W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis / O.W. Griffith // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – V. 27. – P. 922–935.
123. Halliwell B. Free radicals in biology and medicine. Fourth ed. / B. Halliwell, J.M. Gutteridge – New York: University Press Inc., 2007. – 851 p.
124. Hayes J.D. Glutathione transferases / J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2005. – V. 45. – P. 51-88.
125. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells / T. Inoguchi [et al.] // *Diabetes.* – 2000. – V. 49. – P. 1939-1945.
126. Hiran T.S. Detection of superoxide and NADPH oxidase in porcine articular chondrocytes / T.S. Hiran, P.J. Moulton, J.T. Hancock // *Free Radic. Biol. Med.* – 1997. – V. 23. – P. 736–743.

127. Hiran T.S. In situ detection of superoxide anions within porcine articular cartilage / T.S. Hiran, P.J. Moulton, J.T. Hancock // *Br. J. Biomed. Sci.* – 1998. – V. 55. – P. 199–203.
128. Hopkins S.J. Cytokines in synovial fluid. I. The presence of biologically active and immunoreactive IL-1 / S.J. Hopkins, M. Humphreys, M.I. Jayson // *Clin. Exp. Immunol.* – 1988. – V. 72, № 3. – P. 422–427.
129. Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury / J.R. Wispe [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. – P. 23937–23941.
130. Hypoxic-reperfusion injury in the inflamed joint / Blake D.R. [et al.] // *Lancet.* – 1989. – V. 1, № 8633. – P. 289–293.
131. Identification and characterization of a novel microsomal enzyme with glutathione-dependent transferase and peroxidase activities / P.-J. Jakobsson [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 22934–22939.
132. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells / Utomo A [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 43522–43529.
133. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation / H. Pfeifer [et al.] // *FASEB J.* – 2001. – V. 15. – P. 1236–1238.
134. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2 / O. Nosjean [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275, № 40. – P. 31311–31317.
135. IDH1 gene transcription is sterol regulated and activated by SREBP-1a and SREBP-2 in human hepatoma HepG2 cells: evidence that IDH1 may regulate lipogenesis in hepatic cells / I. Shechter [et al.] // *J. Lipid Res.* – 2003. – V. 44, № 11. – P. 2169–2180.

136. Import into mitochondria of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase requires a leader sequence / M. Arai [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1996. – V. 227, № 2. – P. 433–439.
137. Inactivation of NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase by nitric oxide / E.S. Yang [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – V. 33, № 7. – P. 927–937.
138. Induction of antioxidant gene expression in a mouse model of ischemic cardiomyopathy is dependent on reactive oxygen species / S. Sharma [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2006. – V. 40. – P. 2223–2231.
139. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes / R.M. Palmer [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – V. 193. – P. 398–405.
140. Inhibition of inducible NO synthase by TH2 cytokines and TGF beta in rheumatoid arthritic synoviocytes: effects on nitrosothiol production / Borderie D. [et al.] // *Nitric Oxide.* – 2002. – V. 6, № 3. – P. 271–282.
141. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes / A.B.Lerner [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 1958. – V. 80. – P. 2587.
142. Jones D.P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance / D.P. Jones // *Methods Enzymol.* – 2002. – V. 348. – P. 93–112.
143. Joost H.G. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members / H.G. Joost, B. Thorens // *Mol. Membr. Biol.* – 2001. – V.18, №4. – P. 247–256.
144. Kennedy S.H. Strategies to achieve clinical effectiveness: refining existent therapies and pursuing emerging targets / S.H. Kennedy, A.H. Young, P. Bliser // *J. Affect. Disord.* – 2011. – V. 132, Suppl 1. – P. S21–28.
145. Kohen R. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress / R. Kohen, I.Gati // *Toxicology.* – 2000. – V. 148. – P. 149–157.
146. Krinsky N.I. Carotenoid actions and their relation to health and disease / N.I. Krinsky, E.J. Johnson // *Mol. Aspects Med.* – 2005. – V. 26. – P. 459–516.

147. Krinsky N.I. Carotenoid-radical interactions / N.I. Krinsky, K.J. Yeum // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – V. 6. – P. 754-760.
148. Kupfer D.J. Depression and associated sleep disturbances: patient benefits with agomelatine / Kupfer D.J. // *Eur. Neuropsychopharmacol.* – 2006. – V. 16, Suppl 5. – P. S639–643.
149. Lam R.W. Sleep disturbances and depression: a challenge for antidepressants / R.W. Lam // *Int. Clin. Psychopharmacol.* – 2006. – V. 21, Suppl 1. – P. S25–29.
150. Lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: thiobarbituric acid-reactive material and catalytic iron salts in synovial fluid from rheumatoid patients / D. Rowley [et al.] // *Clin. Sci. (Lond).* – 1984. – V. 66. – P. 691-695.
151. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis / S. Taysi [et al.] // *Rheumatol. Int.* – 2002. – V.21. – P. 200-204.
152. Livak K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods.* – 2001. – V. 25, № 4. – P. 402-408.
153. Lu S.C. Regulation of glutathione synthesis / S.C. Lu // *Curr. Top. Cell Regul.* – 2000. – V. 36. – P. 95–116.
154. Lusis A.J. Atherosclerosis / A.J. Lusis // *Nature.* – 2000. – V. 407. – P. 233-241.
155. Maestroni G.J. Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4 / G.J. Maestroni, A. Conti, P. Lissoni // *Cancer Res.* 1994. – V. 54. – P. 4740–4743.
156. Maestroni G.J. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone // G.J. Maestroni, A. Conti, W. Pierpaoli // *J. Neuroimmunol.* – 1986. – V. 13. – P. 19–30.

157. Maestroni G.J. The immunotherapeutic potential of melatonin / G.J. Maestroni // *Expert Opin. Invest. Drugs.* – 2001. – V. 10. – P. 467–476.
158. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy (ADA–EASD) / D.M. Nathan [et al.] // *Diabetologia.* – 2008. – V.51. – P.8 - 11.
159. Marklund S.L. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight / S.L. Marklund // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1982. – V. 79. – P. 7634–7638.
160. Marklund S.L. Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides / S.L. Marklund, A. Bjelle, L.G. Elmqvist // *Ann. Rheum. Dis.* – 1986. – V. 45. – P. 847–851.
161. Marklund, S.L. Superoxide dismutase in extracellular fluids / S.L. Marklund, E. Holme, L. Hellner // *Clin. Chim. Acta.* – 1982. – V. 126. – P. 41–51.
162. Masana M.J. Circadian rhythm of MT 1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus of the C3H/HeN mouse / M.J. Masana, S. Benloucif, M.L. Dubocovich // *J. Pineal Res.* – 2000. – V. 28. – P. 185–192.
163. Meigs J.B. Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study / J.B. Meigs, L.A. Cupples, P.W. Wilson // *Diabetes.* – 2000. – V. 49. – P. 2201–2217.
164. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production / S. Garcia-Maurino [et al.] // *Life Sci.* – 1999. – V. 65. – P. 2143–2150.
165. Melatonin ameliorates high fat diet-induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a PKCzeta-Akt-GSK3beta pathway in hepatic cells / J.M. Shieh [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2009. – V. 47, № 4. – P. 339-344.
166. Melatonin and ulcerative colitis: evidence, biological mechanisms, and future research / P.D. Terry [et al.] // *Inflamm. Bowel. Dis.* – 2009. – V. 15. – P. 134–140.
167. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair / T.W. Fischer [et al.] // *Exp Dermatol.* – 2008. – V. 17, № 9. – P. 713–730.

168. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats / E.J. Sudnikovich [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2007. – V. 569, № 3. – P. 180-187.
169. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation / Tan D. X. et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – V. 29, № 11. – P. 1177-1185.
170. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes / S. Garcia-Maurino [et al.] // *J. Immunol.* – 1997. – V. 159. – P. 574–581.
171. Melatonin improves inflammation processes in liver of senescence-accelerated prone male mice (SAMP8) / S. Cuesta [et al.] // *Experimental gerontology.* – 2010. – V. 45, № 12. – P. 950-956.
172. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions / A. Slominski [et al.] // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2008. – V. 19. – P. 17–24.
173. Melatonin induces gammaglutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells / Y. Urata [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – V. 27. – P. 838-847.
174. Melatonin inhibits human fibroblast-like synoviocyte proliferation via extracellular signal-regulated protein kinase/P21CIP1/P27KIP1 pathways / S.S. Nah [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2009. – V. 47, № 1. – P. 70-74.
175. Melatonin inhibits insulin secretion in rat insulinoma β -cells (INS-1) heterologously expressing the human melatonin receptor isoform MT2 / E. Mühlbauer [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2011. – V. 51, № 3. – P. 361–372.
176. Melatonin is able to prevent the liver of old castrated female rats from oxidative and pro-inflammatory damage / R.A. Kireev [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2008. – V. 45, № 4. – P. 394-402.
177. Melatonin or L-tryptophan accelerates healing of gastroduodenal ulcers in patients treated with omeprazole / K. Celinski [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2011. – V. 50, № 4. – P. 389-394.

178. Melatonin receptors in PC3 human prostate tumor cells / E. Gilad [et al.] // *J. Pineal Res.* – 1999. – V. 26. – P. 211–220.
179. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity / B. Prunet-Marcassus [et al.] // *Endocrinology.* – 2003. – V. 144. – P. 5347–5352.
180. Melatonin's unique radical scavenging properties – roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs / B. Poggeler [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2002. – V. 33. – P. 20–30.
181. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450 / X. Ma [et al.] // *Drug Metab. Dispos.* – 2005. – V. 33. – P. 489–494.
182. Mills G.C. Hemoglobin catabolism, I: glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown / G.C. Mills // *J. Biol. Chem.* – 1957. – V. 229. – P. 189–197.
183. Minard K.I. Dependence of peroxisomal beta-oxidation on cytosolic sources of NADPH / K.I. Minard, L. McAlister-Henn // *J Biol Chem.* – 1999. – V. 274, № 6. – P. 3402-3406.
184. Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells/ N.M. Kamerbeek [et al.] // *Blood.* – 2007. – V. 109. – P. 3560–3566.
185. *Molecular Biology of the Cell* 4th edition / M. Raff [et al.]. – New York: Garland Science, 2002. – 1616 pp.
186. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: The Mel1b melatonin receptor / S. Reppert [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – V. 92. – P. 8734–8738.
187. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes / L.Y. Chang [et al.] // *J. Cell Biol.* – 1988. – V. 107. – P. 2169–2179.
188. Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers / S. Proietti [et al.] // *Cell Mol. Life Sci.* – 2013. – V. 70. – P. 2139–2157.

189. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors / M.L. Dubocovich [et al.] // *Front Biosci.* – 2003. – V. 8. – P. 1093–1108.
190. Molis T.M. Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells / T.M. Molis, L.L. Spriggs, S.M. Hill // *Mol. Endocrinol.* – 1994. – V. 8. – P. 1681–1690.
191. Moulton P.J. NADPH oxidase of chondrocytes contains an isoform of gp91phox subunit / P.J. Moulton, M.B. Goldring, J.T. Hancock // *Biochem. J.* – 1998. – V. 329. – P. 449–451.
192. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant / D.X. Tan [et al.] // *FASEB J.* – 2001. – V. 15, № 12. – C. 2294-2296.
193. NEU-P11, a novel melatonin agonist, inhibits weight gain and improves insulin sensitivity in high-fat/high-sucrose-fed rats / M. She [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2009. – V. 59, №4. – P. 248-253.
194. Neuroendocrinology of melatonin in reproduction: recent development / S.F. Pang [et al.] // *J. Chem. Neuroanat.* – 1998. – V. 14. – P. 157-166.
195. Nitric oxide production by superficial and deep articular chondrocytes / T. Hayashi [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 1997. – V.40. – P. 261–269.
196. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes / R. Masella [et al.] // *Nutr. Biochem.* – 2005. – V. 16, № 10. – P. 577–586.
197. Novel rhythms of N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and its precursor melatonin in water hyacinth: importance for phytoremediation / D.X. Tan [et al.] // *FASEB J.* – 2007. – V. 21, № 8. – P. 1724-1729.
198. Oakley A.J. Glutathione transferases: new functions / A.J. Oakley // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2005. – V. 15, № 6. – P. 716-723.
199. On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals / R. Hardeland [et al.] // *J. Pineal Res.* – 1995. – V. 18, № 2. – P. 104-111.

200. Organs from mice deleted for NRH:quinone oxidoreductase 2 are deprived of the melatonin binding site MT3 / F. Mailliet [et al.] // FEBS Lett. – 2004. – V. 578. – P. 116–120.
201. Ostdal H. Reaction between protein radicals and other biomolecules / H. Ostdal, M.J. Davies, H.J. Anderson // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – V. 33. – P. 201-209.
202. Outside-in signaling in the chondrocyte. Nitric oxide disrupts fibronectin-induced assembly of a subplasmalemmal actin/rho A/focal adhesion kinase signaling complex / R.M. Clancy // J. Clin. Invest. – 1997. – V. 100, № 7. – P. 1789-1796.
203. Oxidation of melatonin by carbonate radicals and chemiluminescence emitted during pyrrole ring cleavage / R. Hardeland [et al.] // J. Pineal Res. – 2003. – V. 34, № 1. – P. 17-25.
204. Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases / S. Bashir [et al.]// Ann. Rheum. Dis. – 1993. – V. 52, № 9. – P. 659-666.
205. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes / J.L. Evans [et al.] // Endocrine Reviews. – 2002. – V. 23, № 5. – P. 599-622.
206. Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin / P.L. Montilla [et al.] // J. Pineal Res. – 1998. – V.25. – P. 94 – 100.
207. Packer L. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant / L. Packer, E.H. Witt, H.J. Tritschler // Free Radic. Biol. Med. – 1995. – V. 19. – P. 227-250.
208. Pangerl B. Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review / B. Pangerl, A. Pangerl, R.J. Reiter // J. Neural Transm. Gen. Sect. – 1990. – V. 81. – P. 17-29.
209. Peroxisomal beta-oxidation of polyunsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*: isocitrate dehydrogenase provides NADPH for reduction of dou

- ble bonds at even positions / C.W. van Roermund [et al.] // *EMBO J.* – 1998. – V. 17, № 3. – P. 677-687.
210. Peroxisomal NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase. Characterization and Activity Regulation during Natural Senescence / F.J. Corpas [et al.] // *Plant Physiol.* – 1999. – V. 121, № 3. – P. 921–928.
211. Peschke E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes / E. Peschke // *J. Pineal Res.* – 2008. – V. 44, № 1. – P. 26-40.
212. Phillips S. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal / S. Phillips, P. Thornalley // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – V. 212. – P. 104-105.
213. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance / X. Yang [et al.] // *Nature.* – 2008. – V. 451, № 7181. – P. 964-969.
214. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis: gonadotropin dependence and immunocytochemical identification / A. Roveri [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. – P. 6142–6146.
215. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase: genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence / R. Brigelius-Flohé [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269, № 10. – P. 7342–7348.
216. Phosphorylation enhances mitochondrial targeting of GSTA4-4 through increased affinity for binding to cytoplasmic Hsp70 / M.A. Robin [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278, № 21. – P. 18960-18970.
217. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways / S.R. Pandi-Perumal [et al.] // *Prog. Neurobiol.* – 2008. – V. 85. – P. 335–353.
218. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily / M. Becker-André [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269, № 46. – P. 28531–28534.
219. Presence of foam cells containing oxidised low density lipoprotein in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis / P.G. Winyard [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 1993. – V. 52. – P. 677-680.

220. Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences / K. Takahashi [et al.] // *J. Biochem. (Tokyo)*. – 1990. – V. 108. – P. 145–148.
221. Primary structure of the nuclear forms of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in rat spermatozoa / M. Maiorino [et al.] // *FEBS Lett.* – 2005. – V. 579. – P. 667–670.
222. Production of active oxygen species by isolated human chondrocytes / Y. Henrotin [et al.] // *Br. J. Rheumatol.* – 1993. – V. 32. – P. 562–567.
223. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress / I. Dalle-Donne [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2003. – V. 329, № 1-2. – P. 23-38.
224. Randomized, double-blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment / M.L. Seabra [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2000. – V. 29. – P. 193–200.
225. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin / C. Rodriguez [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2004. – V. 36. – P. 1–9.
226. Ricciarelli R. Vitamin E: protective role of a Janus molecule / R. Ricciarelli, J.M. Zingg, A. Azzi // *FASEB J.* – 2001. – V. 15, № 13. – P. 2314-2325.
227. Rich S.S. Mapping genes in diabetes. Genetic epidemiological perspective / S.S. Rich // *Diabetes.* – 1990. – V. 39, № 11. – P. 1315–1319.
228. Scavenging of reactive oxygen species by melatonin / Zang LY1, Cosma G, Gardner H, Vallyathan V. // *Biochim Biophys Acta.* – 1998. – V. 1425, № 3. – P. 469-477.
229. Seeger H. Effect of melatonin and metabolites on copper-mediated oxidation of low density lipoprotein / H. Seeger, A.O. Mueck, T.H. Lippert // *Br J Clin Pharmacol.* – 1997. – V. 44, № 3. – P. 283-284.
230. Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity / H. Steinbrenner [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2006. – V. 40, № 9. – P. 936-943.
231. Sen C.K. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction / C.K. Sen // *Curr. Top. Cell Regul.* – 2000. – V. 36. – P. 1–30.

232. Serum selenoprotein P levels in patients with type 2 diabetes and prediabetes: implications for insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis / S.J. Yang [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2011. – V. 96, № 8. – P. E1325-E1329.
233. Shelly C.Lu. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies / C.Lu. Shelly // *FASEB J.* – 1999. - № 13. - P. 1169-1183.
234. Simko F. Melatonin as a potential antihypertensive treatment / F. Simko, L. Paulis // *J. Pineal Res.* – 2007. – V. 42. – P. 319–322.
235. Srivastava R.K. Melatonin modulates glucose homeostasis during winter dormancy in a vespertilionid bat, *Scotophilus heathi* / R.K. Srivastava, A. Krishna // *Comp. Biochem. Physiol. – A. Mol. Integr. Physiol.* – 2010. – V. 155, № 3. - P. 392-400.
236. Stadler J. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide / J. Stadler, M. Stefanovic-Racic, T.R. Billar // *J. Immunol.* – 1991. – V. 147. – P. 3915–3920.
237. Stocker A. Tocopherol-binding proteins: their function and physiological significance / A. Stocker, A. Azzi // *Antioxidants and Redox Signaling.* – 2000. – V. 2, № 3. – P. 397-404.
238. Tabakman R. Neuroprotective effects of carnosine and homocarnosine on pheochromocytoma PC12 cells exposed to ischemia / R. Tabakman, P. Lazarovici, R. Kohen // *J. Neurosci. Res.* – 2002. – V. 68. – P. 463–469.
239. Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPx by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation / M. Maiorino [et al.] // *FASEB J.* – 1998. – V. 12. – P. 1359–1370.
240. The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system / C. Ekmekcioglu [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2003. – V. 35, № 1. – P. 40–44.
241. The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors, blockade of which enhances the activity of fro

- ntocortical dopaminergic and adrenergic pathways / Millan M.J.[et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2003. – V. 306. – P. 954–964.
242. The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line / J. Petranka [et al.] // *J. Pineal Res.* – 1999. – V. 26. – P. 129–136.
243. The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase / D.J. Barra [et al.] // *Biol. Chem.* – 1984. – V. 259, № 20. – P. 12595–12601.
244. Therapeutic effects of TACI-Ig on rat with hadjuvant arthritis / D. Wang [et al.] // *Clinical and Experimental Immunology.* – 2010. - № 163. – P. 225 – 234.
245. Tiku M.L. Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes / M.L. Tiku, J.B. Liesch, F.M. Roberston // *J. Immunol.* – 1990. – V. 145. – P. 690–696.
246. Tomas-Zapico C. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes / C. Tomas-Zapico, A. Coto-Montes // *J. Pineal Res.* – 2005. – V. 39, № 2. – P. 99-104.
247. Townsend D.M. The importance of glutathione in human disease / D.M. Townsend, K.D. Tew, H. Tapiero. // *Biomed. Pharmacother.* – 2003. – V. 57. – P. 145–155.
248. Tuggle C.K. Glutathione reductase is not required for maintenance of reduced glutathione in *Escherichia coli* K-12 / C.K. Tuggle, J.A. Fuchs // *J. Bacteriol.* – 1985. – V. 162, №1. – P. 448–450.
249. Ursini F. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase / F. Ursini, M. Maiorino, C. Gregolin // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – V. 839. – P. 62–70.
250. Vertuani S. The Antioxidants and Pro-oxidants Network: An Overview / S. Vertuani, A. Angusti, S. Manfredini // *Curr. Pharm. Des.* – 2004. – V. 10. – P. 1677-1694.
251. Wang X. The antiapoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases / X. Wang // *CNS Neurosci. Ther.* – 2009. – V. 15. – P. 345–357.

252. Weisiger R.A. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization / R.A. Weisiger, I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 1973. – V. 248. – P. 4793–4796.
253. Wilkie-Grantham R.P. Novel phosphorylation and ubiquitination sites regulate reactive oxygen species-dependent degradation of anti-apoptotic c-FLIP protein / R.P. Wilkie-Grantham, S. Matsuzawa, J.C. Reed // *J. Biol. Chem.* – 2013. – V. 288, № 18. – P. 12777-12790.
254. Wolff S.P. Diabetes mellitus and free radicals / S.P. Wolff // *Br. Med. Bull.* – 1993. – V. 49. – P. 642-652.
255. Wood I.S. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins / I.S. Wood, P.I. Trayhurn // *Br J Nutr.* – 2003. – V. 89, № 1. – P. 3-9.
256. Yakes F.M. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress / F.M. Yakes, B. Van Houten // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94. – P. 514-519.