

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

На правах рукописи

Столярова Анна Олеговна

РЕГУЛЯЦИЯ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА ПРИ
ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС В УСЛОВИЯХ
ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕЛАКСЕНА И ЭПИФАМИНА

Специальность 03.01.04. - Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Воронеж 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	11
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	19
1.1. Ишемия/реперфузия головного мозга.....	19
1.1.1. Патогенез ишемии/реперфузии головного мозга	20
1.1.2. Роль кислото-чувствительных ионных каналов в патогенезе ишемии головного мозга	22
1.1.3. Индукция воспаления в условиях ишемии/реперфузии головного мозга	24
1.1.4. Роль глутамата и гамма-аминомасляной кислоты в ишемическом повреждении головного мозга	29
1.1.5. Кислород-связывающая функция крови в условиях ишемии и реперфузии.....	30
1.1.6. Роль дисфункции митохондрий и активных форм кислорода в патогенезе ишемии/реперфузии головного мозга	32
1.2. Антиоксидантная система организма	36
1.2.1. Ферментативное звено антиоксидантной системы	37
1.2.2. Неферментативное звено антиоксидантной системы	53
1.2.2.1. Водорастворимые антиоксиданты.....	53
1.2.2.2. Жирорастворимые низкомолекулярные антиоксиданты	55
1.3. Характеристика мелатонина	57
1.3.1. Синтез мелатонина в организме	57
1.3.2. Биологическая роль мелатонина в организме	60
1.3.3. Вещества, корректирующие уровень мелатонина.....	62

1.3.3.1. Мелаксен	62
1.3.3.2. Эпифамин.....	63
1.3.3.3. Вальдоксан.....	64
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	66
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	66
2.1. Объект исследования	66
2.2. Характеристика тестируемых препаратов.....	66
2.3. Методы исследования.....	67
2.3.1. Моделирование ишемии/реперфузии головного мозга у крыс	67
2.3.2. Подготовка материала для биохимических исследований	67
2.3.3. Оценка уровня мелатонина по содержанию мелатонинсульфата у крыс.....	68
2.3.4. Определение содержания лактата в головном мозге крыс	68
2.3.5. Измерение активности ферментов	68
2.3.5.1. Определение активности ферментов, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАД и НАДФ	69
2.3.5.1.1. Определение активности глутатионпероксидазы.....	69
2.3.5.1.2. Определение активности глутатионредуктазы	70
2.3.5.1.3. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	70
2.3.5.1.4. Определение активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы	70
2.3.5.2. Определение активности глутатионтрансферазы.....	71
2.3.5.3. Определение активности аконитатгидратазы	71
2.3.5.4. Определение активности супероксиддисмутазы	72
2.3.5.5. Определение активности каталазы.....	73

2.3.6. Оценка уровня транскриптов генов	74
2.3.6.1. Выделение тотальной РНК.....	74
2.3.6.2. Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция	74
2.3.7. Оценка степени развития апоптотических процессов	76
2.3.7.1. Определение степени фрагментации ДНК.....	76
2.3.7.1.1. Выделение тотальной ДНК	76
2.3.7.1.2. Электрофорез ДНК	77
2.3.7.2. Оценка активности каспаз.....	78
2.3.8. Определение содержания компонентов неферментативной антиоксидантной системы.....	78
2.3.8.1. Определение концентрации восстановленного глутатиона	78
2.3.8.2. Определение содержания цитрата.....	79
2.3.9. Оценка оксидативного статуса	80
2.3.9.1. Определение интенсивности биохемилюминесценции	80
2.3.9.2. Определение содержания диеновых конъюгатов	81
2.3.9.3. Оценка окислительной модификации белков	82
2.3.10. Унифицированный метод определения содержания общего белка по биуретовой реакции	83
2.4. Статистическая обработка экспериментальных данных	85
ГЛАВА 3. АНАЛИЗ ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕЛАКСЕНА И ЭПИФАМИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ НЕЙРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ КРЫС С ИШЕМИЕЙ/РЕПЕРФУЗИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА.....	87
3.1. Концентрация мелатонинсульфата в моче экспериментальных животных в условиях развития ишемии/реперфузии и введения мелаксена и эпифамина	87

3.2. Уровень лактата в мозге крыс в условиях развития ишемии/реперфузии и введения мелаксена и эпифамина.....	88
3.3. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на показатели окислительного стресса в тканях крыс при развитии ишемии/реперфузии головного мозга.....	90
3.4. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на уровень транскриптов генов факторов HIF-1 и NF-kB у крыс в условиях развития ишемии/реперфузии головного мозга.....	99
ГЛАВА 4. ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОТЕКАНИЯ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ МЕЛАКСЕНА НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС.....	103
3.1. Степень фрагментации ДНК в мозге крыс в условиях развития ишемии/реперфузии и введения мелаксена	103
3.2. Воздействие мелаксена на активность каспаз при ишемии/реперфузии головного мозга у крыс.....	106
ГЛАВА 5. ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕЛАТОНИН-КОРРЕГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КОМПОНЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА.....	109
5.1. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на функционирование супероксиддисмутазы и каталазы в тканях крыс с ишемией/реперфузией головного мозга	109
5.2. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на функционирование глутатионовой антиоксидантной системы в условиях развития ишемии/реперфузии головного мозга у крыс	117
5.3. Воздействие мелаксена и эпифамина на активность ферментов-поставщиков НАДФН для глутатионовой антиоксидантной системы	128

5.4. Транскрипционная регуляция функционирования компонентов антиоксидантной системы в условиях развития ишемии/реперфузии головного мозга у крыс и введения мелатонин-корректирующих препаратов.....	133
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	136
ВЫВОДЫ.....	143
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	145

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2,4-ДНФГ - 2,4- динитрофенил-гидразин

АГ – аконитатгидратаза

АДФ – аденозиндифосфат

АОС – антиоксидантная система

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

АФМК - N1-ацетил-N2-формил-5-метилкинурамин

Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

ГАМК - γ-аминомасляная кислота

ГП - глутатионпероксидаза

ГР - глутатионредуктаза

ГТ - глутатионтрансфераза

ДК – диеновые конъюгаты

ИРГМ – ишемия/реперфузия головного мозга

кДНК – комплементарная ДНК

КДО - кривая диссоциации оксигемоглобина

КТФК – кислородтранспортная функция крови

мРНК – матричная РНК

мтДНК – митохондриальная ДНК

H_2O_2 – пероксид водорода

НАД - никотинамидадениндинуклеотид

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотид фосфат

НАДФ-ИДГ – НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа

НАДФН - никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный

HO_2^{\cdot} - пероксильный радикал

НСТ – нитросиний тетразолий

$O_2^{\cdot-}$ - супероксидный анион-радикал

ОН[•] - гидроксильный радикал

ОСГ⁻ - гипохлорит-анион

ПГК – программируемая гибель клеток

ПОЛ – пероксидное окисление липидов

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени

СГК – средство гемоглобина к кислороду

СО – свободнорадикальное окисление

СОД - супероксиддисмутаза

ТАЕ - трис-ацетат-ЭДТА буфер

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ФАД - флавинадениндинуклеотид

ФМС - феназинметасульфат

ЦОГ - циклооксигеназа

ЦП - церулоплазмин

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ЭТЦ – электронтранспортная цепь митохондрий

AIF - apoptosis-inducing factor

AMPA-рецепторы - рецепторы α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты

AP-1 - активирующий протеин-1

ARE – antioxidant response element

BNip3 - BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3

cNOS – конститутивные NO-синтазы

CREB - cAMP response element-binding protein

DAMP - damage-associated molecular patterns, связанные с повреждением молекулярные паттерны

eNOS - эндотелиальные NO-синтазы

FOXO1 - forkhead box protein O1

GSH – глутатион восстановленный

GSSG – глутатион окисленный

HIF1 - hypoxia-inducible factor 1

HRE - hypoxia response element

HSP - белки теплового шока

ICAM-1 - молекула межклеточной адгезии 1

IFN - интерферон

IκBs - ингибиторы белков NF-κB

IKKβ - IκB-киназы бета

IL - интерлейкины

I_{max} – максимальная вспышка биохемилюминесценции

iNOS - индуцибельные NO-синтазы

Ire1 - inositol-requiring enzyme 1

MCP - моноцитарный хемоаттрактантный белок

MIP - макрофагальный белок

MMP - матричная металлопротеиназа

MyD88 - myeloid differentiation primary response gene 88, ген первичного ответа миелоидной дифференциации 88

NF-κB - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NMDA-рецепторы - N-метил-D-аспаратат-рецепторы

nNos - нейрональные NO-синтазы

NO – монооксид азота

NOS – NO-синтазы

NRF2 - Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

Omni/HtrA2 - omni high temperature requirement protein A2

PTP - permeability transition pores, митохондриальные поры повышенной проницаемости

S – светосумма биохемилюминесценции

Smac/DIABLO - Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI

tgα₂ - тангенс угла наклона касательной к кривой биохемилюминесценции

TGF - трансформирующий фактор роста

TLR - toll-like receptors, toll-подобные рецепторы

TNF – фактор некроза опухоли

UPR - unfolded protein response

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. На протяжении последних лет одной из насущных остаётся проблема инсульта – острого патологического состояния, частота встречаемости которого в Российской Федерации имеет тенденцию к увеличению. Среди факторов, обуславливающих социальную значимость инсульта, стоит упомянуть его широкую распространенность, тяжелые осложнения у перенёсших заболевание пациентов, высокий уровень смертности и инвалидизации среди больных [49].

Главной причиной возникновения инсульта выступает ишемия головного мозга – сложный патологический процесс, развивающийся в условиях кислородного голодания ткани и сопряженный с формированием острого нейронального энергодефицита и последующего развития необратимых повреждений в нервной ткани [187]. Восстановление кровоснабжения после ишемического периода, называемое реперфузией, способно привести к усугублению нарушений обменных процессов в головном мозге и формированию реперфузионного повреждения [132].

В условиях снижения рН среды на фоне накопления продукта анаэробного метаболизма глюкозы – лактата, происходит усиленная генерация продуктов свободнорадикального окисления (СО) и активация окислительного стресса, являющегося универсальным механизмом тканевых повреждений, характерным для широкого ряда патологических состояний [190, 47]. Защиту от негативного действия свободных радикалов на биомолекулы обеспечивает АОС, резервов которой в ряде случаев может оказаться недостаточно. Нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза и лактат-ацидоз представляют собой важнейший пусковой фактор формирования инфаркта мозга в ишемизированной области.

В связи с этим, высокую актуальность имеют исследования, направленные на выяснение особенностей регуляции свободнорадикального гомеостаза при ишемическом и реперфузионном повреждении мозга, а также

на поиск способов коррекции возникающего в ходе патогенеза подобных заболеваний окислительного стресса.

Значительный интерес представляют вопросы транскрипционной регуляции адаптивного ответа организма на стрессовые воздействия, обусловленные ишемическим и реперфузионным повреждением. Среди нейровоспалительных факторов можно выделить NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – редокс-чувствительный индуктор воспалительного процесса, играющего существенную роль в развитии патологий, вызванных ишемией. HIF1 (hypoxia-inducible factor 1) представляет собой главный фактор регуляции метаболизма кислорода, способствующий, помимо прочего, переключению окислительного типа обмена на гликолитический, с последующим накоплением лактата и возникновением опосредованных ацидозом нарушений. Активность работы АОС на транскрипционном уровне контролируют факторы NRF2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) и FOXO1 (forkhead box protein O1), вносящие существенный вклад в выживаемость клеток в условиях окислительного стресса. Таким образом, анализ воздействия на функционирование данных факторов транскрипции мелаксена и эпифамина, в комплексе с исследованием их влияния на свободнорадикальный гомеостаз, позволит оценить потенциальные протекторные возможности тестируемых средств на различных уровнях структурно-функциональной организации и регуляции метаболических процессов в условиях развития ишемии/реперфузии головного мозга (ИРГМ).

К одному из перспективных направлений современной биомедицины относится разработка новых способов терапии сопряженных с развитием оксидативного стресса заболеваний путем коррекции уровня мелатонина в организме. Данный гормон обладает рядом биологических функций, в частности регуляцией суточных ритмов, иммунорегулирующей, антиоксидантной, онкостатической активностью [209]. Мелатонин представляет собой антиоксидант широкого спектра действия, способный как

непосредственно, так и косвенно обезвреживать свободные радикалы, уменьшая тем самым интенсивность СО и степень деградации ДНК, и обладающий способностью активировать цитопротекторные механизмы [267]. Одним из препаратов, корректирующих уровень мелатонина, является мелаксен, представляющий собой синтетический аналог мелатонина, синтезированный из аминокислот растительного происхождения. Другим средством с мелатонин-корригирующей активностью является эпифамин – препарат шишковидной железы крупного рогатого скота, в состав которого входит комплекс белков и нуклеопротеидов, обладающих избирательным действием на клетки эпифиза.

Исходя из вышесказанного, можно заключить, что исследования, посвященные анализу нейропротекторного эффекта и воздействия на свободнорадикальный гомеостаз мелатонин-корригирующих препаратов при ишемическом и реперфузионном поражении головного мозга представляются актуальными, так как вносят существенный вклад в выяснение путей коррекции метаболических сдвигов при патологии и разработку новых подходов в терапии данных нарушений.

Цели и задачи исследования.

Целью настоящей работы явилось исследование воздействия мелатонин-корригирующих препаратов – мелаксена и эпифамина, на интенсивность свободнорадикального окисления биомолекул и апоптоза, а также экспрессию генов, ответственных за контроль нейровоспалительных процессов и мобилизацию антиоксидантной защиты.

Для достижения поставленной цели были сформированы следующие задачи:

1. Анализ содержания лактата и уровня транскриптов генов факторов NF- κ B и NIF-1 в мозге животных в условиях введения мелаксена и эпифамина на фоне развития ИРГМ.

2. Оценка интенсивности протекания свободнорадикальных процессов на фоне инъекций тестируемых препаратов животным с индуцированной ИРГМ.

3. Исследование воздействия мелатонин-корректирующих препаратов на активность протекания апоптотических процессов в мозге крыс с патологией.

4. Оценка активности и уровня транскриптов генов супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы у крыс в условиях развития ИРГМ и введения мелаксена и эпифамина.

5. Анализ активности глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), глутатионтрансферазы (ГТ), содержания восстановленного глутатиона (GSH), а также уровня транскриптов генов *GPX1* и *GSR* при моделировании ИРГМ и применении мелатонин-корректирующих препаратов.

6. Оценка уровня транскриптов генов факторов NRF2 и FOXO1 в мозге крыс с ИРГМ и животных, которым на фоне развития патологии вводили мелаксен и эпифамин.

7. Исследование ферментативной активности основных поставщиков НАДФН для функционирования глутатионовой АОС – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДФ-ИДГ) при введении тестируемых препаратов на фоне развития патологии.

Научная новизна. Впервые было осуществлено комплексное исследование воздействия мелаксена и эпифамина в условиях индукции ИРГМ на интенсивность протекания свободнорадикальных и апоптотических процессов, уровень мРНК ряда транскрипционных факторов (NF-kB, NRF2, FOXO1, NIF1), активность антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза, ГП, ГР, ГТ) и содержание неферментативных компонентов АОС (GSH, цитрат), уровень транскриптов генов антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *CAT*, *GPX1*, *GSR*), активности некоторых ферментов окислительного метаболизма

(Г6ФДГ, НАДФ-ИДГ, аконитатгидратаза (АГ)). Продемонстрировано позитивное воздействие тестируемых протекторов на показатели интенсивности протекания СО и содержание лактата в мозге крыс с ИРГМ. Показано наличие у мелаксена и эпифамина способности снижать степень ишемического повреждения и активность нейровоспалительных процессов, что выражалось уменьшением уровня транскриптов генов факторов NF1 и NF-kB – главных регуляторов потребления клетками кислорода и формирования воспалительного ответа. Обнаружено, что возростающая в условиях ИРГМ интенсивность протекания апоптотических процессов снижалась при коррекции уровня мелатонина, что было сопряжено с уменьшением степени фрагментации ДНК и активности ключевых ферментов, реализующих программу апоптоза – каспазы-3 и каспазы-8. Выявлена тенденция к нормализации функционирования антиоксидантных ферментов, заключающаяся в изменении значений их активности и уровня мРНК генов в направлении контрольных показателей. Показано также приближение к контролю показателей активности НАДФН-генерирующих ферментов, поставляющих восстановительные эквиваленты для глутатионовой АОС, в условиях введения мелатонин-корректирующих препаратов на фоне ИРГМ. Продемонстрировано корректирующее воздействие мелаксена и эпифамина на уровень мРНК транскрипционных факторов NRF2 и FOXO1, играющих ключевую роль в регуляции функционирования АОС и выживаемости клеток в условиях окислительного стресса. Предложена гипотетическая схема, демонстрирующая роль мелатонин-корректирующих препаратов в регуляции свободнорадикального гомеостаза при развитии ИРГМ.

Практическая значимость. Полученные в ходе исследования данные способствуют углублению представлений о состоянии окислительно-восстановительного гомеостаза в условиях ишемии и реперфузии, а также о биологической активности и регуляторном потенциале мелатонина. Помимо этого, результаты, полученные в ходе проведенной работы, могут служить

фундаментом для разработки новых способов коррекции повреждений головного мозга ишемического генеза, основанных на корректировке уровня эндогенного мелатонина – гормона, обладающего выраженной нейропротекторной и антиоксидантной активностью. Таким образом, результаты исследования могут служить базисом для создания нового подхода, включающего сочетание применения при ишемических и реперфузионных повреждениях головного мозга традиционного лечения с антиоксидантной терапией, в частности, с использованием препаратов, корректирующих уровень мелатонина.

Наряду с этим, применяемые в ходе выполнения диссертационной работы методы и подходы могут представлять интерес с точки зрения анализа ряда информативных показателей с целью диагностики состояния окислительного стресса при ишемических поражениях головного мозга, а также для мониторинга интенсивности протекания окислительных и апоптотических процессов в тканях мозга в процессе лечения.

Материалы исследования применяются в учебной работе на медико-биологическом факультете Воронежского государственного университета при чтении курсов «Свободнорадикальные процессы в биосистемах», «Медико-биологические аспекты социально-значимых патологий», «Патобиохимия», «Физико-химические основы патологических процессов», «Молекулярные механизмы адаптации к стрессовым факторам». Полученные результаты также используются при проведении практикумов, выполнении курсовых и выпускных квалификационных работ студентами Воронежского государственного университета.

Апробация работы. Основные результаты, полученные в ходе выполнения исследования, представлены на II Международной научно-практической конференции «Основные проблемы в современной медицине» (Волгоград, 2015), 6-й Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2016» (Воронеж, 2016), Международной научно-практической конференции, посвященной 81-летию Курского

государственного медицинского университета и 50-летию фармацевтического факультета «Университетская наука: Взгляд в будущее» (Курск, 2016), Международной научно-практической конференции «Наука и современное общество: взаимодействие и развитие» (Уфа, 2017), Международной научно-практической конференции «Актуальные направления научных исследований: перспективы развития» (Чебоксары, 2017), Международной научно-практической конференции «Исследования различных направлений современной науки» (Москва, 2018).

Публикации. Основные результаты диссертационной работы изложены в 20 публикациях, из них 4 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 2 – в рецензируемых журналах в системе Web of Science и Scopus, 1 – в рецензируемом журнале в системе Scopus.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Коррекция уровня мелатонина при внутрибрюшинном введении мелаксена (дозы 5-10 мг/кг) и эпифамина (дозы 1,25-2,5 мг/кг) крысам на фоне ИРГМ обеспечивает нейропротекторный и антиоксидантный эффект, сопровождающийся изменением в направлении контрольных значений концентрации лактата, показателей интенсивности свободнорадикального окисления, уровня транскриптов генов нейровоспалительных факторов - NIF1 и NF-kB, а также активности апоптотических процессов.

2. Показано корригирующее воздействие мелаксена и эпифамина на активность и содержание ряда ферментативных и неферментативных компонентов антиоксидантной системы, мобилизация которых носила компенсаторный характер при развитии ИРГМ у крыс.

3. Позитивное регулирующее воздействие мелаксена и эпифамина на антиоксидантную систему было взаимосвязано с уменьшением уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов и сопряженных с их функционированием факторов NRF2 и FOXO1 в условиях торможения интенсивности протекания свободнорадикального окисления.

4. Воздействие мелаксена и эпифамина способствовало изменению в направлении контрольных показателей активности ряда ферментов окислительного метаболизма, изменяющейся при развитии ИРГМ у крыс.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 178 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов (3 главы), заключения, выводов, списка литературы (317 источников). Иллюстративный материал включает 4 таблицы и 23 рисунка.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Ишемия/реперфузия головного мозга

Одной из ключевых проблем современного здравоохранения является проблема инсульта, что обусловлено широкой распространенностью данной патологии и значительными негативными последствиями для пациентов, заключающимися в высоком уровне смертности и инвалидизации. В последнее время с каждым годом растет значимость инсульта как социально-значимого заболевания, что имеет неразрывную связь с увеличением количества людей в популяции с сердечно-сосудистыми заболеваниями, а также с процессом старением населения. При этом в Российской Федерации наблюдается тенденция к учащению случаев инсульта [49].

Одной из главных причин инсульта головного мозга выступает ишемия – многокомпонентный патологический процесс, начинающийся с формирования острого нейронального энергодефицита и последующей активации реакций «ишемического каскада», что в итоге приводит к нарастанию в нервной ткани необратимых повреждений [187]. В свою очередь, восстановление перфузии ишемизированной ткани способствует усугублению нарушений обменных процессов в головном мозге, что приводит к формированию реперфузионного повреждения [132].

К числу главных патобиохимических механизмов ишемии головного мозга можно отнести угнетение энергопродукции, изменение аэробного гликолиза на анаэробный, гипоксию головного мозга, нарушение процессов активного трансмембранного переноса ионов, накопление недоокисленных метаболитов обмена липидов и углеводов, гидролиза АТФ и других макроэргических соединений, интенсификацию СО и развитие окислительного стресса, усиленную генерацию провоспалительных цитокинов, глутаматную эксайтотоксичность, опосредованную оксидом азота, нарушение системы гемостаза [169, 190].

1.1.1. Патогенез ишемии/реперфузии головного мозга

Патогенез церебральной ишемии включает ряд звеньев.

Тяжесть гипоксического повреждения головного мозга определяется рядом параметров, в том числе парциальным давлением газов крови и кислотно-основным состоянием. Дефицит кислорода в клетке, выступающего в роли конечного акцептора электронов, приводит к угнетению функционирования окислительно-восстановительных процессов в электрон-транспортной цепи, способствуя закономерному в данных условиях снижению интенсивности окислительного фосфорилирования. При уменьшении оксигенации ишемизированных тканей скорость потока электронов по дыхательной цепи снижается. Это приводит к тому, что вместо концентрации АДФ лимитирующим фактором регуляции скорости тканевого дыхания становится содержание кислорода.

Дефицит аэробного окисления активизирует анаэробный гликолиз, что способствует накоплению молочной кислоты [27]. Вместе с тем, анаэробный гликолиз не способен полностью компенсировать энергетические потребности клетки, замыкая, таким образом, порочный круг энергодефицита.

Накопление недоокисленных метаболитов липидного и углеводного обмена, гидролиз макроэргических соединений в результате превращения НАД и НАДФ в восстановленные формы, и другие факторы, уменьшающие утилизацию ионов водорода вследствие угнетения синтеза АТФ, приводят к их избыточному образованию и закислению среды [170]. Избыток водородных ионов, помимо этого, приводит к торможению гликолиза за счет ингибирования таких ключевых ферментов, как глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, что способствует усугублению необратимого энергетического дефицита [23]. Таким образом, происходящее на раннем постишемическом периоде резкое снижение рН крови представляет собой неблагоприятный прогностический признак [11]. Ацидоз приводит к

угнетению обменных процессов и ионного транспорта, способствует повышению внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} и активации реакций глутамат-кальциевого каскада [2767–140], формированию отека клеток, а также оказывает прямой цитотоксический эффект путем изменения физико-химических свойств нейрональных мембран и эндотелия сосудов [74].

Степень деструктивного воздействия острой локальной ишемии головного мозга зависит, в первую очередь, от тяжести и продолжительности уменьшения мозгового кровотока [11]. В ряде экспериментальных работ показано, что при уменьшении интенсивности кровотока до 50–55 мл/100 г/мин (при средних стандартных показателях 70 мл/100 г/мин) – первого критического уровня, возникает угнетение биосинтеза белка. При снижении уровня кровотока на 50% относительно нормального показателя (второй критический уровень) происходит активация анаэробного гликолиза, сопровождающегося развитием лактат-ацидоза и цитотоксического отека ткани. Уменьшение кровотока до третьего критического уровня, составляющего 20 мл/100 г/мин, приводит к возникновению энергетического дефицита, сопровождающегося соответствующими изменениями процесса транспорта кислорода в дыхательной цепи митохондрий до его конечного потребителя – цитохромоксидазы. Данное состояние сопровождается чрезмерной секрецией возбуждающих аминокислот, а также дисфункцией каналов активного ионного транспорта. Падение уровня мозгового кровотока ниже 10 мл/100 г/мин сопровождается формированием аноксической деполяризации мембран и последующим развитием в данной зоне инфаркта мозга [87]. Установлено, что формирование основной части инфаркта завершается за 3–6 ч, вместе с тем процесс его «доформирования» длится еще 2–3 суток с момента проявления начальных клинических признаков заболевания [12].

Известно, что при ишемических повреждениях мозга происходит интенсивное высвобождение возбуждающих аминокислот из нейронов, а также нарушение их обратного захвата пресинаптическими окончаниями

вследствие дефицита энергии, необходимой для функционирования транспортных систем [45, 9]. Накопление лактата при гипоксических и ишемических состояниях приводит к торможению гликолитической энергопродукции [25], а одним из условий активации гликолиза и энергетики в целом является удаление молочной кислоты из ткани, которое возможно двумя путями: повышением утилизации лактата и путем увеличения кровообращения в зоне ишемии. Известно, что при ишемии равновесие в лактатдегидрогеназной системе нарушается, приводя к избыточному образованию молочной кислоты [45].

1.1.2. Роль кислото-чувствительных ионных каналов в патогенезе ишемии головного мозга

Чрезмерное поступление в клетку ионов Ca^{2+} и их переход в активную форму с помощью связывания с внутриклеточным рецептором кальмодулином приводит к активации кальмодулин-зависимых ферментов: протеинкиназ, эндонуклеаз, фосфолипаз. Запуск соответствующих реакций сопровождается множественными повреждениями биомакромолекул, а также активацией механизмов некротической и программированной гибели нейрона.

Кислотно-чувствительные ионные каналы, представляющие собой двойные ионные каналы H^+ - Ca^{2+} в мембране нейронов, играют очень важную роль в метаболических нарушениях и проявлении токсичности ионов кальция. Хотя механизм двойного сопряжения ионов H^+ и Ca^{2+} остается неизвестным, он играет важную роль в церебральном ишемическом повреждении. Ионные каналы, чувствительные к кислотности, широко распространены в головном мозге, а закрытый канал H^+ -лигандов опосредует токсический эффект ионов кальция. Кислоточувствительные ионные каналы в основном экспрессируются в центральной нервной системе, но также присутствуют в сенсорных ганглиях периферических нервов. Данные каналы

в основном распределены в кортикальном полушарии, гиппокампе, бульбусольфакториусе и мозжечке. К каналам, связанным с церебральной ишемией, также относятся проницаемые для ионов Ca^{2+} каналы, которые при активации позволяют ионам кальция покидать клетку.

Многочисленные исследования подтвердили, что кислоточувствительные ионные каналы играют важную роль в патогенезе ишемии/реперфузии [57, 66, 121].

Изменения концентрации H^+ и рН могут активировать кислоточувствительные каналы во время ацидоза после ишемии головного мозга, что способствует притоку кальция и возникновению перегрузки данным ионом. Вышеуказанный процесс приводит к дальнейшей активации чувствительных к кислотам ионных каналов и поступлению Ca^{2+} , что усугубляет церебральное ишемическое повреждение нервов. Помимо притока в цитоплазму через каналы, кальций высвобождался из митохондрий и эндоплазматического ретикулума, вызывая перегрузку во время раннего повреждения головного мозга. При патологических состояниях кальциевые каналы в нейронных клетках находятся в аномально активированном состоянии. В условиях возникновения перегрузки кальцием в нейронных клетках, большое количество иона переносится из внеклеточной жидкости в аксоны нервных окончаний, где кальций и кальмодулин формируют комплекс Са-кальмодулин. Этот комплекс может активировать Са-кальмодулин-зависимые протеинкиназы, которые индуцируют постсинаптическое фосфорилирование белков. Кальмодулин является кальций-связывающим белком, который широко распространен в ядрах эукариотических клеток, и способен выполнять свою физиологическую функцию только после соединения с ионами кальция. После повреждения головного мозга происходит ряд патологических и физиологических изменений, которые в основном связаны с перегрузкой кальцием в нервных клетках, изменением уровня нейротрансмиттеров, ацидозом клеток и многими другими сложными изменениями. Перегрузка кальцием считается

ключевым событием и решающим фактором в повреждении головного мозга. Кальмодулин, как основной рецепторный белок внутриклеточного Ca, играет важную роль в синтезе и высвобождении нейротрансмиттеров, трансдукции сигналов и активации апоптотических генов [112].

Устойчивый рост внутриклеточного свободного кальция, приводящий к кальциевой перегрузке, может также вызвать выделение кальция в митохондриях. Данный эффект способен привести к нарушению энергетического метаболизма, синтеза АТФ, функционирования ионных насосов [270]. Целостность и функциональность митохондрий являются критическими для жизнедеятельности большинства типов клеток вследствие способности вырабатывать активные формы кислорода (АФК) и высвобождать про-апоптотические белки из межмембранного пространства [244].

1.1.3. Индукция воспаления в условиях ишемии/реперфузии головного мозга

В дополнение к прямому тканевому повреждению, вызванному ишемией в результате окклюзии артерий, возникает также и вторичное повреждение, обусловленное эксайтотоксичностью, кальциевой перегрузкой, окислительным стрессом, апоптозом, аутофагией и нейровоспалением. В частности, индукция нейровоспаления, которая включает взаимодействие между нейронами и глиальными клетками, может мобилизовать ткань головного мозга для генерирования каскадных эффектов усиления патологического процесса под воздействием множества цитокинов и соответствующих им сигнальных путей [308].

В острой фазе (от минуты до часа) церебральной ишемии ишемическое поражение вызывает быструю активацию микроглии в паренхиме головного мозга [169]. В условиях данной патологии морфология микроглии при активации варьирует от разветвленной до амeboидной формы [228]. На

начальном этапе ишемии поврежденные нейроны несут связанные с повреждением молекулярные паттерны (damage-associated molecular patterns, DAMP), которые впоследствии распознаются toll-подобными рецепторами (toll-like receptors, TLR), такими как TLR4, и другими паттерн-распознающими рецепторами на поверхности реактивной микроглии; это распознавание приводит к высвобождению микроглиализированных медиаторов, что способствует вторичному повреждению после инсульта. Реактивные микроглии / макрофаги могут быть выявлены уже через 2 часа после ишемии головного мозга и обнаруживаться в течение недели после ишемического инсульта [175]. Реактивная микроглия разделена на два фенотипа: классически и альтернативно активированные фенотипы (M1 и M2, соответственно) [254]. M1 микроглия продуцирует провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухолей - (TNF- α), интерлейкины (IL-1 β , IL-6, IL-18), хемокины, моноцитарный хемоаттрактантный белок- (MCP-) 1 и макрофагальный белок - (MIP-) 1, интерферон- (IFN-) , матричную металлопротеиназу - (MMP-) 9 и АФК [310], оказывающие вредные воздействия в ранней фазе. В отличие от этого, микроглия M2 секретирует противовоспалительные медиаторы, такие как IL-4, IL-10, IL-13, трансформирующий фактор роста (TGF) и фактор роста инсулина-1, опосредующие нейропротективные эффекты в отсроченной фазе [303]. При церебральной ишемии активация микроглии сопровождается реактивным астроглиозом, который также вызывает избыточную секрецию цитокинов и обострение ишемического повреждения мозга [310].

Микроглиальная и астроцитарная секреция провоспалительных медиаторов быстро усиливает экспрессию молекул адгезии на эндотелии [305]. Во время острой церебральной ишемии/реперфузии периферические лейкоциты активируются и вовлекаются вместе с эндотелиальными клетками в процесс ишемического повреждения. Взаимодействие лейкоцитов и эндотелиальных клеток при воспалении опосредуется различными молекулами адгезии, включая селектины, интегрины, молекулу

межклеточной адгезии - ICAM-1 и молекулу адгезии сосудистых клеток-1 [315]. Селектины, содержащие L-селектин на лейкоцитах и E- и P-селектины на эндотелиальных клетках, представляют собой семейство гликопротеинов лектиноподобной адгезии, которые регулируют рекрутирование лейкоцитов [315]. Интегрины, включая ассоциированный с лейкоцитами антиген-1 (CD11a / CD18), экспрессируемый всеми лейкоцитах, и макрофаг-1 (MAC-1; CD11b / CD18), экспрессирующийся на нейтрофилах и моноцитах, являются трансмембранными гликопротеинами и опосредуют лейкоцито-эндотелиальные взаимодействия [123]. При острой церебральной ишемии активация интегринов облегчает устойчивое присоединение лейкоцитов к эндотелиальному ICAM-1; лейкоциты впоследствии проникают сквозь эндотелиальную мембрану в паренхиму мозга. Таким образом, плотные соединения между эндотелиальными клетками гематоэнцефалического барьера разрушаются и становятся более проницаемыми, что приводит к инфильтрации лейкоцитами [123]. В то же время реактивная микроглия, тромбоциты и инфильтрация лейкоцитами, дополнительно высвобождающими IL-1, IL-6, TNF- α , АФК, MCP-1, MIP-1, IL-8 и MMPs (главным образом MMP-9), усиливают ишемическое повреждение [232].

В нормальных условиях рекрутирование лейкоцитов через гематоэнцефалический барьер в паренхиму мозга способствует поддержанию иммунного статуса центральной нервной системы [278]. В структуру данного барьера входят эндотелиальные клетки, базальная мембрана, ножки астроцитов и перициты, формирующие высокоселективный барьер проницаемости, который отделяет клетки крови от межтканевой жидкости головного мозга и поддерживает гомеостаз головного мозга [219]. Однако во время острой фазы церебральной ишемии инфильтруемые лейкоциты и реактивная микроглия синтезируют и секретируют MMP (главным образом MMP-2 и MMP-9) и АФК, что увеличивает проницаемость гематоэнцефалического барьера [257]. Нарушение барьера способствует попаданию циркулирующих лейкоцитов и внутрисосудистой жидкости в мозг, которые

вызывают вазогенный отек и геморрагическую трансформацию, что приводит к обострению церебрального инфаркта [278].

Во время ишемического инсульта головного мозга умирающие клетки выделяют DAMP, включая белки теплового шока (HSP), β -амилоид, гиалуроновую кислоту, гепаринсульфат и АТФ, стимулируя таким образом TLR, которые экспрессируются на микроглии / макрофагах. Более того, микроглия / макрофаги трансформируются при стимуляции в фенотипы M1 и M2 и секретируют различные цитокины в ответ на ишемическое повреждение [70– V. 12. – article 6]. TLR являются ключевыми компонентами врожденной иммунной системы, а стимуляция TLR (в основном TLR2 и TLR4) в микроглии / макрофагах и Т-лимфоцитах также оказывает сильное регуляторное влияние на постишемическую воспалительную реакцию [271]. Во время церебрального ишемического повреждения TLR способствуют высвобождению цитокинов и хемокинов и активации транскрипционного фактора, посредством межклеточных сигнальных путей. Связывание HSP, такого как HSP60 и HSP70, или HMGB1 с TLR2 и TLR4 инициирует экспрессию ядерным фактором κ B (NF- κ B) индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS), TNF- α , IL-1, IL-6 и ICAM-1, активируя MyD88-зависимый (myeloid differentiation primary response gene 88 – ген первичного ответа миелоидной дифференциации 88) сигнальный путь и усугубляя церебральное ишемическое повреждение [311].

NF- κ B играет решающую роль в регуляции сотен генов, участвующих в выживаемости и гибели клеток [268]. Так, NF- κ B можно активировать через несколько внутриклеточных сигнальных путей, связанных с защитой, воспалением и апоптозом [126]. В мозге данный фактор регулирует экспрессию различных наборов генов, таких как антиапоптотические, проапоптотические и провоспалительные гены, тем самым играя двойную роль в выживании и гибели нейронов [53]. Семейство NF- κ B включает в себя пять членов, а именно p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 / p105 (NF- κ B 1) и p52 / p100 (NF- κ B 2), которые образуют различные гомо- и гетеродимерные

комплексы [271]. Наиболее распространенной формой NF- κ B является гетеродимер p65 / p50 [175]. В нестимулированном состоянии ингибиторы белков NF- κ B (inhibitors κ B, I κ Bs), главным образом I κ B α , I κ B β и I κ B ϵ , сохраняют в неактивной форме димеры NF- κ B в цитозоле. В то же время, в ответ на различные внеклеточные стимулы, включая инфекцию, провоспалительные цитокины и связывание рецептора с антигеном, активированные комплексы киназы I κ B фосфорилируют I κ B белки, что приводит к их убиквитинированию и протеасомной деградации и, следовательно, индуцирует высвобождение NF- κ B для транслокации в ядро и активации транскрипции генов-мишеней [175]. Во время церебральной ишемии активированные димеры NF- κ B транслоцируются в ядро, где они избирательно связываются с определенными последовательностями ДНК, называемыми κ B (каппа-би) сайтами. Промоторные домены содержат большое количество генов провоспалительного характера и впоследствии вызывают трансляцию TNF- α , IL-1, IL-6, ICAM-1, PGE2, COX-2 и iNOS [242]. К активаторам NF- κ B относятся некоторые провоспалительные цитокины, такие как TNF- α и IL-1, гены которых регулируются самим NF- κ B. Подобные цитокины индуцируют модуляцию по принципу положительной обратной связи, что приводит к усилению воспалительного ответа и обострению церебрального ишемического инсульта [263].

В состоянии покоя гетеродимерная, основная форма NF- κ B p65/p50, удерживается, главным образом, в цитоплазме в связанном виде с белком-ингибитором NF- κ B-альфа (I κ B α). Вскоре после нидукции ишемии фосфорилирование и активация I κ B-киназы бета (IKK β), ключевой киназы пути активации NF- κ B, приводит к фосфорилированию и протеолизу I κ B α , что позволяет димеру p65 / p50 транслоцироваться в ядро и стимулировать экспрессию провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α и IL-1 β . На ранней стадии церебральной ишемии / реперфузии этот процесс происходит в нейронах и глиальных клетках, что приводит к чрезмерной воспалительной реакции в головном мозге и вызывает серьезное повреждение, включая

разрушение гематоэнцефалического барьера и отек мозга, являющиеся основной причиной ранней смерти у пациентов после инсульта. Исходя из этого, блокирование сигнального пути NF- κ B является эффективной стратегией уменьшения воспалительного повреждения после инсульта [308].

1.1.4. Роль глутамата и гамма-аминомасляной кислоты в ишемическом повреждении головного мозга

Среди возбуждающих аминокислот ведущую роль отводят глутамату, который рассматривается в качестве медиатора, обеспечивающего широкий спектр ответов нейрона на различные сигналы. На данный момент идентифицирована целая система глутаматных рецепторов, функционирование которых опосредует деполяризацию синаптической мембраны, т.е. обеспечивает формирование потенциала действия. Это ионотропные рецепторы (Ionotropic glutamate receptors, iGluR), к которым относятся NMDA-рецепторы (N-метил-D-аспартат-рецепторы), каинатные и AMPA-рецепторы (рецепторы α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты), опосредующие движение $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -ионов через синаптическую мембрану [173]. Изменение внеклеточного содержания глутамата, обусловленное аноксической деполяризацией нейрональной мембраны, является исходным ключевым компонентом патогенеза ишемии мозга.

Так, установлена двухфазность релизинга глутамата: начальный пик его выброса в экстрацеллюлярное пространство связан с предшествующим увеличением концентрации Ca^{2+} и деполяризацией мембраны [306].

На начальных стадиях патобиохимического каскада ишемического повреждения головного мозга большое значение принадлежит тормозному нейромедиатору γ -аминомасляной кислоте (ГАМК), выполняющей протективную функцию. В некоторых экспериментальных исследованиях показано, что усиление высвобождения в первые минуты дофамина и

глутамата во внеклеточное пространство у крыс и мышей с моделированной фокальной ишемией выполняет роль триггерного механизма в формировании повреждений центральной коры с последующим развитием неврологического дефицита [259]. Наряду с глутаматом и дофамином повышается также выброс во внеклеточное пространство ГАМК, содержание которой увеличивается на два порядка по сравнению с нормальной концентрацией. Низкий уровень ГАМК и повышенная концентрация аспартата в первые дни заболевания у больных с ишемическим инсультом являются признаками неблагоприятного прогноза, хотя уровень глутамата в цереброспинальной жидкости может соответствовать нормальным значениям [185].

1.1.5. Кислород-связывающая функция крови в условиях ишемии и реперфузии

В механизме транспорта кислорода ключевую роль выполняет кислородтранспортная функция крови (КТФК), которая обуславливает процесс поступления O_2 в ткани и поддержание уровня тканевого pO_2 посредством моделирования кислородсвязывающих свойств гемоглобина.

Вместе с тем, роль КТФК и сродства гемоглобина к O_2 (СГК) в патогенезе церебральной ишемии изучена недостаточно. Результаты исследований, в которых осуществлялось целенаправленное понижение СГК и увеличение $p_{50}O_2$ при моделировании глобальной ишемии головного мозга, противоречат данным экспериментов, показывающих негативное влияние гипероксии при реоксигенации мозга [258]. Так, установлено, что применение аллостерического модификатора СГК, приводящего к сдвигу кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) вправо, вело к улучшению исхода неполной церебральной ишемии у животных, но было неэффективно при глобальной ишемии [115]. Сдвиг КДО вправо является позитивным на начальных этапах гипоксии, тогда как в условиях реоксигенации он приводит

к нарушению прооксидантно-антиоксидантного баланса, что способствует чрезмерной генерации свободных радикалов и повреждению структур клеток [23].

Следовательно, регуляция СГК может являться одним из факторов защиты от повреждения тканей АФК при ишемии/реперфузии. Сдвиг КДО вправо, отражающий снижение СГК, характеризуется усиленным поступлением O_2 в ткани и активацией пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в период реперфузии [157]. Интенсификация свободнорадикальных процессов происходит за счет дисбаланса между количеством доноров и акцепторов электронов в тканях и дисрегуляции АОС, что имеет место при нарушении кислородного транспорта.

КТФК направлена на адекватное снабжение кислородом органов и тканей. СГК при этом определяет способность молекулы гемоглобина к оксигенации и деоксигенации, условия диффузии O_2 в ткани и интенсивность энергетического обмена, в конечном итоге обуславливая величину тканевого pO_2 . Существенный вклад в процесс оксигенации гемоглобина оказывает эффект Бора, физиологический смысл которого состоит в прямой зависимости между СГК и рН крови, поскольку данный показатель определяет конформацию и константу диссоциации α - и β -цепей гемоглобина, взаимодействующих с O_2 [234]. Увеличение рН крови приводит к росту СГК, в то время как снижение кислотности – к уменьшению. СГК, в свою очередь, регулирует деоксигенацию венозной крови, так как гемоглобин обладает буферными свойствами, заключающимися в способности поддерживать стационарный уровень pO_2 и обеспечивать оптимальную оксигенацию тканей, предохраняя их от гипероксического повреждения. Роль оставшегося в крови O_2 при этом заключается в поддержании гемоглобина в функционально активной конформации, а также обеспечении резервов для компенсации локальных потребностей энергетического обмена. Поэтому, несмотря на наличие в области повышенного его потребления, например в головном мозге, условий для

полной десатурации оксигемоглобина (снижение рН, замедление кровотока, повышение рСО₂), абсолютная его деоксигенация не происходит [15].

1.1.6. Роль дисфункции митохондрий и активных форм кислорода в патогенезе ишемии/реперфузии головного мозга

Исследования последних лет показали, что ишемия и последующая реперфузия представляют собой ключевое звено в формировании функциональных и морфологических нарушений при инфарктах и инсультах, постреанимационной болезни, возникают при многих хирургических манипуляциях, в частности трансплантации солидных органов. В качестве одного из главных механизмов развития нарушений в тканях и органах в условиях воздействия ишемии и реперфузии выделяют дисфункцию митохондрий [186]. Установлено, что нарушение функционирования данных органелл вызывает ряд эффектов на клеточные процессы: обуславливает развитие энергетического дефицита, окислительного стресса, индуцирует процессы программированной клеточной гибели [282]. Исходя из этого, митохондрии можно рассматривать в качестве одной из перспективных мишеней при разработке технологий протекции тканей и органов от ишемических и реперфузионных повреждений, а также коррекции их последствий.

Ключевая роль митохондрий в синтезе АТФ, реализации процессов апоптоза, участие в генерации АФК и депонировании Ca²⁺ обуславливает вклад митохондриальной дисфункции в развитие широкого ряда патологических процессов.

К настоящему времени в наибольшей степени изучена взаимосвязь между нарушением биосинтеза АТФ в митохондриях и функциональной активности клеток и тканей. Показано, что при снижении концентрации в клетке АТФ на 10 — 20 %, активность всех энергозависимых процессов уменьшается на 70 — 80 %. К результатам дефицита АТФ можно отнести

подавление анаболизма, нарушение функционирования ионных насосов и, следовательно, клеточного ионного гомеостаза, угнетение функций цитоскелета [26].

Подавление энергопродукции в митохондриях приводит к угнетению β -окисления жирных кислот с последующим развитием расстройств липидного обмена и накопления ацил-карнитинов, ацил-СоА-тиоэфиров, триглицеридов и церамидов, токсичных по отношению к клеткам. Митохондрии нервной ткани составляют исключение, поскольку особенность их метаболизма состоит в неспособности осуществлять β -окисление жиров [159].

Интересной представляется способность ингибирующего воздействия расстройств функционирования митохондрий глиальных клеток и нейронов на клиренс экстрацеллюлярного глутамата. К ключевым механизмам данного процесса относят развитие ацидоза, энергетического дефицита и окислительную модификацию глутаматных транспортеров по остатку цистеина [84].

В настоящее время известно, что работа электрон-транспортной цепи митохондрий сопряжена с образованием некоторого количества супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$), представляющего собой побочный продукт функционирования комплексов дыхательной цепи. В физиологически нормальных митохондриях деструкцию структур органеллы активными формами кислорода предотвращает митохондриальная антиоксидантная система, включающая в частности Mn-содержащую СОД, ГП, тиоредоксин-2, глутатион [35]. Образование $O_2^{\cdot-}$ митохондриями значительно интенсифицируется в условиях нарушения переноса электронов между комплексами электрон-транспортной цепи, приводящего к неполному восстановлению конечного акцептора – кислорода. При этом недостаточная активность антиоксидантной системы митохондрии будет обуславливать развитие окислительного стресса, усиление процессов ПОЛ, окисление белковых молекул и нуклеиновых кислот. Данные изменения, в конечном счете, приводят к угнетению физиологических функций клетки, накоплению

ошибок в митохондриальной и ядерной ДНК. Нарушение структуры генома митохондрий, в свою очередь, приводит к дефектам в процессе переноса электронов в электрон-транспортной цепи, что результируется в еще более сильной генерации активных форм кислорода митохондриями [282].

Литературные данные свидетельствуют, что генерируемые митохондриями радикалы играют определенную роль во внутриклеточной передаче сигнала рецепторов эндотелина, тромбоцитарного фактора роста, трансформирующего фактора роста β -1, фактора роста фибробластов 2, и др. Помимо этого, АФК могут влиять на активность ряда факторов транскрипции, включая AP-1 (активирующий протеин-1), проапоптотический белок p66Shc и NF- κ B. Таким образом, усиление генерации АФК может приводить к активизации воспалительного процесса в тканях, формированию гипертрофических и фиброзных изменений. Показано также, что избыток свободных радикалов посредством нарушения ионообменных процессов миокарда, связанного с повреждением ионных каналов и цитоплазматической мембраны, приводит к понижению сократительной активности кардиомиоцитов и кальциевой чувствительности миофиламентов [140].

Известно, что инсульт сопровождается развитием в пораженном участке мозга нейротоксических процессов благодаря бесконтрольному возрастанию содержания таких нейромедиаторов, как глутамин и дофамин в экстрацеллюлярном пространстве. Показано, что избыток глутамина активирует нерегулируемое поступление ионов Ca^{2+} в цитоплазму, что приводит к дисфункции митохондрий [84].

В повреждение митохондрий вносит также вклад «ответ на нарушение нативной структуры белков» (unfolded protein response — UPR), активизирующийся при гипоксии. Известно, что под воздействием стресса, обусловленного UPR, эндоплазматический ретикулум может способствовать формированию в митохондриях дегенеративных изменений вследствие

выхода в цитозоль ионов кальция и белка Ire1 (inositol-requiring enzyme 1), ассоциированного с мембраной эндоплазматического ретикулула [313].

В настоящее время показано, что дисфункция митохондрий может быть вызвана активацией транскрипционного фактора HIF-1, индуцируемого гипоксией и обуславливающего возрастание экспрессии проапоптотического белка BNip3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3). Известно, что данный белок способствует быстрому открытию пор PTP, следствием чего является уменьшение митохондриального мембранного потенциала и возрастание генерации АФК [97].

Окислительный стресс представляет собой неспецифическое патогенетическое звено множества дегенеративных заболеваний, процесса старения и клеточной смерти. АФК, наиболее активно генерирующиеся в митохондриях, выступают в качестве ключевого фактора развития в клетке окислительного стресса в условиях гипоксии, ишемии и реперфузии [33]. Участие митохондрий в образовании свободных радикалов вносит существенный вклад в регуляцию апоптоза при патофизиологических процессах в нейронах. Предрасположенность нервной ткани к окислительному стрессу обусловлена высокой интенсивностью окислительного метаболизма и усиленной генерацией свободных радикалов, высокой концентрацией прооксидантов и липидов, сравнительно небольшой активностью ферментов АОС и наличием нейронов с высокой активностью NO-синтазы (NOS). Свое деструктивное действие АФК оказывают, в первую очередь, на митохондриальную мембрану, с чем связано окисление SH-группы Cys-56 в белке, обеспечивающем сопряженный транспорт АТФ/АДФ, что приводит к формированию митохондриальных пор PTP, через которые способен проникать ряд низкомолекулярных веществ [39, 181]. АФК также оказывают существенное влияние на содержание ионов кальция в митохондриальном матриксе и цитозоле, обуславливая их закачку из экстрацеллюлярного пространства и внутриклеточных депо путем активации кальциевых транспортеров [139].

Еще одной чувствительной мишенью действия АФК является митохондриальная ДНК (мтДНК). Активная генерация в митохондриях свободных радикалов и относительно слабая система репарации обуславливают большую частоту мутаций мтДНК относительно ядерной. Действие АФК – основная причина специфических замен нуклеотидов в молекуле ДНК митохондрий. Так, OH^\bullet оказывает деструктивное воздействие на ДНК за счет окисления азотистых оснований, их модификации, нарушения хромосомной структуры. Появление подобных мутаций способно приводить к развитию различных патологий и клеточной гибели, либо её злокачественному перерождению. Особенно опасным нарушение мтДНК представляется в связи с постепенным накоплением мутаций, обусловленным длительным воздействием АФК. Повреждение генома митохондрий приводит к нарушению экспрессии и функционирования ряда важнейших митохондриальных белков, с чем связывают снижение эффективности клеточного дыхания, усиление генерации АФК и другие процессы, формирующие основу митохондриальной теории старения [281].

Таким образом, ишемия и реперфузия оказывает множественное воздействие на митохондрии, приводя к нарушениям в липидном спектре мембран, функционировании дыхательных комплексов и способствуя выходу в цитозоль танатогенных митохондриальных факторов и чрезмерной генерации АФК.

1.2. Антиоксидантная система организма

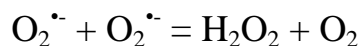
Ключевую роль в детоксикации АФК выполняет АОС организма, включающая в себя соединения-антиоксиданты, способные ослаблять интенсивность СО и нейтрализовывать свободные радикалы. При этом образуются различные молекулярные продукты, обладающие значительно более низкой токсичностью и достаточно легко метаболизирующиеся, либо

выводящиеся из организма. В состав АОС организма входят два основных компонента: ферментативное и неферментативное звенья.

1.2.1. Ферментативное звено антиоксидантной системы

Первую линию защиты от воздействия свободных радикалов составляют ферменты СОД и каталаза.

СОД – один из основных внутри- и внеклеточных ферментов АОС, включающий в себя несколько форм металлоферментов, катализирующих реакцию дисмутации $O_2^{\cdot-}$, что обеспечивает поддержание концентрации данного радикала на стационарном уровне:



В ходе катализа в активном центре фермента происходят последовательные реакции восстановления и окисления ионов металлов переменной валентности.

В настоящее время выделяют несколько изоферментов СОД, различающихся строением активного центра: Cu-, Zn-СОД, локализованная в цитоплазме большинства клеток эукариот, Mn-СОД, представленная в митохондриях гепатоцитов и миокардиоцитов, а также Fe- и Ni-СОД, имеющиеся, главным образом, у прокариот. В первой форме данного фермента ионы меди принимают участие в каталитических реакциях [314], тогда как ионы цинка необходимы для поддержания оптимальной конформации белковой молекулы, обеспечивающей функционирование фермента [128].

Cu-, Zn-СОД – гомодимер с молекулярной массой 33,2 кДа, субъединицы которого имеют молекулярный вес 16,300 кДа [150]. Каждая из них соединена с одним ионом цинка и меди, имеет в своей структуре дисульфидный мостик, тиоловую группу, а также концевую ацетилированную аминокгруппу [166]. При этом расстояние между ионами Cu и Zn в активном сайте настолько невелико, что происходящие в ходе

функционирования фермента изменения микроокружения одного иона воздействуют на микроокружение другого.

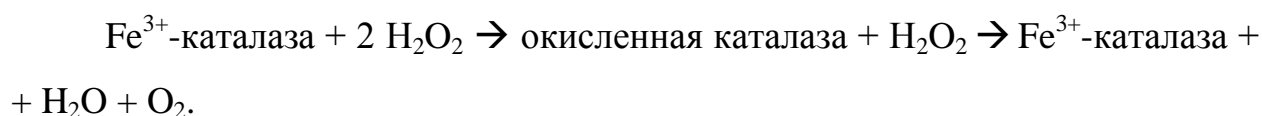
Конкурентный ингибирующий эффект на СОД способны оказывать одновалентные анионы гидроксила и хлора, что обусловлено их способностью связывать ионы меди из активного сайта [269]. Кроме того, на фермент ингибирующее действие оказывает цианид [274] и H_2O_2 , который, однако, в небольших концентрациях восстанавливает СОД, благодаря чему фермент приобретает достаточно высокую устойчивость к кислороду [48].

Mn-СОД и Fe-СОД представляют собой димеры со сходным аминокислотным составом молекулярной массой 39500 Да и 38700 Да соответственно [316]. Данные ферменты не ингибируются цианидом у прокариот [146], а активность Fe-СОД зависит от содержания ионов железа в среде, а не от концентрации кислорода [46]. Различающаяся роль Mn-СОД и Fe-СОД в защите от $O_2^{\cdot-}$ обуславливает разную локализацию их в клетке *E. Coli*: Mn-СОД служит для детоксикации в матриксе прокариот эндогенных АФК, в то время как Fe-СОД работает как «ловушка периплазматического пространства» экзогенных радикалов.

Несколько позже была выделена экстрацеллюлярная форма СОД, состоящая из четырех субъединиц массой около 30 кДа с Cu и Zn в активном центре, по структуре представляющая собой два димера-гликопротеида, соединенных дисульфидной связью [317]. По своей первичной структуре все субъединицы экстрацеллюлярной СОД одинаковы [294], но отличаются по аминокислотному составу и антигенным свойствам от структуры субъединиц цитоплазматической формы фермента [229]. Кроме того, данные формы СОД закодированы в разных локусах и обладают различающимися каталитическими свойствами [19]. Также экстрацеллюлярная СОД несет по шесть остатков цистеина в каждой субъединице, в то время как цитоплазматическая форма – по четыре. Основные места локализации экстрацеллюлярной СОД – внеклеточное пространство [163], данная форма является основным изоферментом плазмы крови, лимфы, синовиальной

жидкости [280], присутствует в глиальных клетках и фибробластах [196]. Кроме этого, высокая активность фермента обнаружена в сердце, легких [107], почках и плаценте [239]. Данная форма СОД ингибируется под действием цианида и H_2O_2 [197], а ионы железа приводят к блокированию его секреции [285]. Экстрацеллюлярная СОД обладает высокой аффинностью к ряду гликозаминогликанов, в частности гепарину и сульфату гепарина [122]. Исходя из этого, экстрацеллюлярную СОД подразделяют на три формы – А, В и С: не имеющую сродства, характеризующуюся низким сродством и обладающую высокой аффинностью к гепарину соответственно [154]. Первые две формы главным образом локализуются в плазме крови, в то время как форма С связана с гликокаликсом эндотелиоцитов сосудистой стенки и обладает в несколько раз более высокой активностью, чем внутриклеточная СОД [171].

Каталаза – гем-содержащий фермент, способный катализировать разложение H_2O_2 до воды и O_2 без акцепторов кислорода, а сама молекула субстрата выступает в роли донора электронов. По своей структуре данный фермент представляет собой гомотетрамер в форме тетраэдра, имеющий четыре гемовых группы. Главным местом локализации каталазы в клетках являются пероксисомы, в меньшей степени – цитоплазма и микросомы. При этом в цитоплазме, где содержание H_2O_2 невелико, данный фермент обезвреживает его малоэффективно, что связано с невысоким сродством к своему субстрату. В пероксисомах же концентрация H_2O_2 значительно выше, и каталаза активно разлагает молекулы этого соединения [34]. Наибольшая активность фермента наблюдается в печени, однако содержится он практически во всех органах и тканях организма. В процессе каталитического разложения H_2O_2 под действием каталазы можно выделить два этапа:



В окисленной форме каталаза способна функционировать подобно пероксидазе, а в качестве субстрата для данной реакции могут быть

использованы такие доноры водорода, как этанол, метанол, формальдегид, формиат, и другие.

Необходимо также отметить взаимосвязь активности данного фермента и СОД, обусловленную их сопряженным функционированием при элиминации $O_2^{\cdot-}$, в ходе которой образуется промежуточный продукт – H_2O_2 , являющийся субстратом для каталазы. Таким образом, эти ферменты, локализованные в разных компартментах клетки, представляют собой звенья одного метаболическом пути детоксикации $O_2^{\cdot-}$.

Церулоплазмин (ЦП), ген которого расположен на хромосоме 3 — 3q23-q24, представляет собой медьсодержащую феррооксидазу (КФ.1.16.3.1). Данный белок, являясь β -глобулином, входит в α -2-глобулиновую фракцию человеческой плазмы крови. Молекулярная масса фермента, состоящего из 1046 аминокислотных остатков, составляет 132 кДа [292]. ЦП формирует тригональную структуру, включающую 6 доменов и 6 ионов меди. Известно, что ионы меди в составе фермента существуют в трех вариантах. Первый тип ионов характеризуется максимумом поглощения при 610 нм, чем определяется насыщенный голубой цвет ферментов этого класса, называемых часто «голубыми белками». Координационную сферу ионов данного типа образуют два атома азота гистидина, сульфгидрильная группа цистеина и остаток метионина. Второй тип иона обладает типичным ЭПР-спектром двухвалентной меди и не оказывает какого-либо вклада в оптические свойства ЦП [105]. Два иона меди третьего вида формируют биядерный медный комплекс, поглощающий свет при длине волны 330 нм.

Для человека описаны две изоформы ЦП, представляющие собой сывороточные гликопротеиды, состоящие из одной полипептидной цепи [109]. 2-8% массы молекулы занимает её углеводный компонент, содержащий 9 олигосахаридных цепей, включающих глюкозамин (15,7–19,2 %), маннозу (14,2 %), галактозу (12,3 %), фукозу (1,6 %), сиаловые кислоты (8,6 %) [255]. На медь при этом приходится 0,27–0,32 % от массы всего белка [149].

Биосинтез молекул ЦП осуществляется, главным образом, в гепатоцитах [156]. Вместе с тем, данный фермент способен синтезироваться также и в ряде других тканей. Так, экспрессия гена ЦП характерна для лимфоцитов [250], тканей мозга [86], мононуклеарных клеток селезенки [167], эндометрия матки [304], бронхов [85]. В клетках легких ЦП выявляется на всем протяжении воздухоносных путей и в альвеолах [86], при этом в период активизации воспаления в клетках эпителия бронхов, особенно крупных, его уровень значительно возрастает.

Основным пулом ЦП является плазма крови, где его содержание составляет 300–580 мг/л. Помимо этого, фермент также присутствует в синовиальной жидкости и мышечных тканях. Рецепторы к ЦП выявлены на купферовских клетках [296], астроцитах [76], эритроцитах [71], фибробластах [56], лейкоцитах и моноцитах [172], мембранах клеток аорты и кардиомиоцитов [283]. Таким образом, широкая распространенность рецепторов указывает на существенную роль ЦП, участвующего, как в ферментативных, так и неферментативных процессах [301].

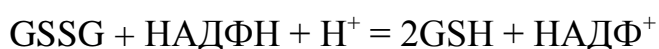
ЦП является одним из основных антиоксидантных компонентов плазмы крови. Показано, что антиоксидантные свойства данного фермента связаны с его электроноакцепторными свойствами [93]. Ферроксидазная активность ЦП, способность усиливать связывание окисленных ионов железа с трансферрином обуславливает предотвращение неферментативных процессов, приводящих к генерации АФК и активизации ПОЛ. Установлено, что ЦП обладает СОД-подобной активностью [5], хотя и более низкой, чем у внутриклеточной СОД. В экспериментах с генерированием $O_2^{\cdot-}$ методом импульсного радиолиза было найдено, что ЦП не влияет непосредственно на кинетику гибели радикалов, а взаимодействует с их предшественниками — гидратированными электронами [69]. Несколько позже было показано, что ЦП реагирует не с $O_2^{\cdot-}$, а с восстановленной формой ксантиноксидазы [297]. Таким образом, ЦП обладает слабой супероксиддисмутазной активностью, не являясь при этом скавенджером $O_2^{\cdot-}$.

ГП представляет собой фермент АОС, существующий в 8 формах. ГП1 – цитоплазматический фермент, присутствующий практически во всех тканях, включая форменные элементы крови, катализирующий детоксикацию токсических пероксидов, в том числе H_2O_2 . Субстратом для ГП2 и ГП3 также являются пероксиды, но ГП2 экспрессируется, в первую очередь, в клетках желудочно-кишечного тракта, а ГП3 представляет собой секретлируемый фермент и выявляется в плазме крови и молоке [119]. ГП4, в свою очередь, катализирует разложение фосфолипидных гидропероксидов, присутствует как в цитоплазме, так и в митохондриях, и синтезируется в большинстве тканей, особенно активно в семенниках. Предполагается также участие ГП4 в апоптотическом процессе, защите митохондрий от действия АФК [141], эмбриональном развитии [307] и синтезе семенной жидкости [119]. В состав молекул ферментов ГП1-4 входит селеноцистеин. ГП5 экспрессируется в придатках семенников и является важным компонентом для поддержания фертильности. ГП6, участвующий в метаболизме обоняния и присутствующий в обонятельном эпителии, является селенопротеином человека и не обнаруживается у грызунов [80]. Сравнительно недавно была открыта седьмая форма ГП. ГП7, как и ГП5, содержит в своей структуре цистеин, обладает способностью нивелировать развитие оксидативного стресса в раковых клеточных линиях молочной железы [119], а также принимает участие в фолдинге белка в эндоплазматическом ретикулуме [80]. В этом же процессе, как полагают, играет определенную роль ГП8, обнаруженная с помощью филогенетического анализа. ГП5-8 представляют собой цистеин-содержащие изоформы фермента [80]. Se, в том числе в виде селеноцистеина, включается в структуру селенопротеинов в процессе их синтеза, участие в котором принимает 3'-нетранслируемая область мРНК и транс-активирующие белки [155].

У млекопитающих ГП1 имеет молекулярную массу от 83 до 95 кДа, представляет собой гомотетрамер с весом субъединиц 22-23 кДа, состоящих из 202-204 аминокислотных остатков [262]. Катализ разложения пероксидов

данным ферментом осуществляется с помощью бисубстратного механизма типа «пинг-понг», при этом не наблюдается кинетика насыщения. В процессе ферментативного восстановления пероксидов с селеноцистеином в активном центре формируется промежуточное стабильное соединение [52], после осуществления реакции на селеноле активного сайта образуется селеновая кислота. После этого образовавшуюся кислоту восстанавливает одна молекула GSH, образуя промежуточное соединение – глутатионилированный селенол [178]. Еще одна молекула GSH восстанавливает связь глутатионилированного селенола с образованием окисленного глутатиона (GSSG), обуславливая возврат активного центра фермента в исходное состояние. Последующее ревосстановление GSSG катализирует НАДФН-зависимая ГР. Таким образом, ГП1 регулирует окислительно-восстановительный гомеостаз путем ферментативной детоксикации пероксидов за счет окисления GSH – ключевого клеточного низкомолекулярного тиола. Активность ГП1 также опосредованно связана с соотношением НАДФ⁺/НАДФН, восстановленная форма которого необходима для ревосстановления GSSG. Окисление GSH, катализируемое ГП1, может оказывать воздействие на интенсивность пентозофосфатного пути посредством изменения соотношения НАДФ⁺/НАДФН [300]. Как было показано в ходе ряда работ, достаточное содержание в клетке GSH предотвращает окислительную инактивацию ГП1, обуславливая важность состояния клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза для функционирования фермента [249].

ГР – гомодимерный флавопротеид, в состав которого входят 450 аминокислотных остатков [145] и по 1 молекуле ФАД на каждой субъединице, фермент катализирует реакцию:



ГР выполняет важную роль в поддержании клеточного окислительно-восстановительного баланса [55], а также необходимого содержания GSH, требующегося для протекания ряда процессов в клетке [201]. Данный белок

является типичным представителем семейства флавопротеиновых дисульфидных оксидоредуктаз, что обусловлено наличием в каждой его субъединице четырех четко разделенных областей: НАДФ-связывающего домена, ФАД-связывающего домена, центрального и интерфейс домена. На границе двух субъединиц расположены два активных центра фермента, где происходит связывание с аминокислотными остатками обеих глобул субстрата – GSH. Таким образом, каталитически активным фермент может быть только в димерной форме. На границе между субъединицами димера можно выделить две области. Верхняя область обеспечивает, в первую очередь, связывание доменов и составляет большую область контакта между субъединицами, в то время как существенно меньший нижний участок образуется на месте контакта двух α -спиральных частей цепи, выступающих из ФАД-связывающего домена. Верхний участок связывания представляет собой одну из самых жестких частей белка, включает порядка 75% межсубъединичных водородных связей, а высокая степень его консервативности у ГР различных видов обуславливает важность участка в сборке димера. Нижняя область, в свою очередь, относительно слабо консервативна. Помимо этого, значительную роль в обеспечении связывания димеров играют молекулы воды, которыми заполнена полость между верхним и нижним участком связывания [221].

В ходе ферментативного катализа ГР происходит восстановление флавина посредством НАДФН, последующее окисление редокс-активным остатком цистина молекулы флавина, и образование цистеина и тиолята аниона. GSSG впоследствии может быть восстановлен в обратимых реакциях тиол-дисульфидного обмена [142].

GSH (γ-глутамил-цистеинил-глицин) – один из ключевых низкомолекулярных внутриклеточных тиолов, синтезирующийся практически во всех эукариотических клетках (рис. 1).

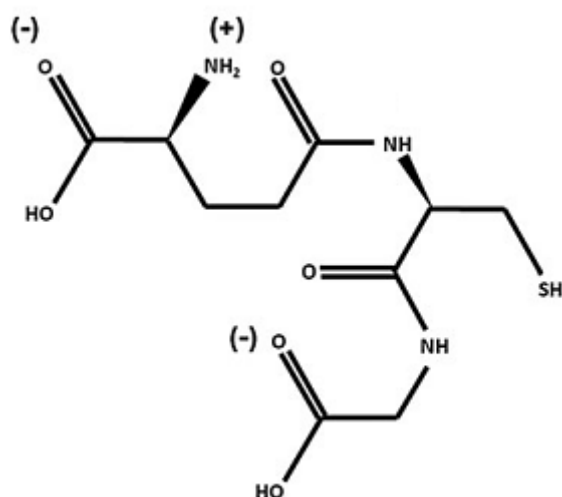


Рис. 1. Восстановленный глутатион.

Строение молекулы GSH и достаточно высокая его концентрация в клетках (от 1 до 10 мМ для клеток печени и ряда видов злокачественных клеток) опосредует его антиоксидантную функцию, значительный вклад в регуляцию клеточного редокс-статуса, участие в функционировании систем детоксикации, биосинтезе эйкозаноидов, регулировании широкого ряда механизмов клеточной сигнализации, включая регуляцию клеточного цикла апоптоза, экспрессии генов [295]. Основной клеточный пул данного тиола представлен в форме GSH, 85-90% которого локализуется в цитоплазме, а оставшаяся часть после синтеза транслоцируется в ядро, митохондрии, пероксисомы и цитоплазматический ретикулум [289]. На долю GSSG при этом приходится около 1% от его общей внутриклеточной концентрации. Поддержание в клетке оптимального соотношения GSH/GSSG вносит значительный вклад в её нормальное функционирование и жизнеспособность. Дефицит GSH подвергает риску окислительного повреждения клеточные структуры, а дисбаланс в регуляции его концентрации наблюдается при многих патологических процессах, включая канцерогенез, муковисцидоз, нейродегенеративные заболевания, ВИЧ-инфекцию [295].

Биосинтез GSH осуществляется в два энергозависимых этапа, составляющих γ -глутамильный цикл из шести ферментативных реакций. Первый этап характеризуется образованием пептидной связи между

глутаматом и цистеином – лимитирующей стадией в синтезе GSH, которая катализируется γ -глутамилцистеинлигазой. В ходе реакции второго этапа, катализируемой глутатионсинтетазой, происходит связывание глицина с γ -глутамилцистеином с образованием GSH [191]. Гидролиз специфической связи между остатками глутамата и цистеина в молекуле GSH способна осуществить γ -глутамилтрансфераза, которая обеспечивает перенос γ -глутамильного остатка на аминокислоту, делая возможным ее транспорт в клетку, фермент локализован на внешней стороне цитоплазматической мембраны определенных типов клеток [191]. В ходе функционирования γ -глутамилтрансферазы образуется дипептид цистеинилглицин, который впоследствии подвергается действию дипептидазы и разлагается до цистеина и глицина – субстратов для ферментов γ -глутамилцистеинлигазы и глутатионсинтетазы соответственно. γ -Глутамилциклотрансфераза обеспечивает разрыв связи между аминокислотой и γ -глутамильным остатком с образованием свободной аминокислоты и 5-оксопролина, под действием оксопролиназы превращающегося в субстрат для γ -глутамилцистеинлигазы – глутамат. Таким образом, в результате деградации внеклеточного GSH входящие в его состав аминокислоты могут попадать внутрь клетки и включаться в процесс биосинтеза данного тиола. Главным источником GSH плазмы крови является печень, и нарушение его синтеза в данном органе может привести к системным межорганным нарушениям обмена GSH [243].

Восполнение его концентрации возможно не только за счет синтеза *de novo*, но и в результате функционирования ГР, восстанавливающей GSSG до GSH за счет окисления НАДФН [191].

Биологическая активность молекулы GSH связана с наличием у него реакционноспособной тиоловой группы остатка цистеина. Ключевая функция GSH заключается в защите клеток от токсического действия продуктов окислительного стресса, в том числе путем ферментативного восстановления пероксидов под действием ГП. В то же время, помимо

данного фермента восстановление органических гидропероксидов до соответствующих спиртов возможно благодаря пероксидазной активности Se-независимой ГТ, косубстратом которой также является GSH. Кроме того, этот трипептид участвует в восстановлении окисленной формы глутаредоксина, образующейся в результате восстановления дисульфидов [108], выступает в роли низкомолекулярного антиоксиданта, являясь эффективным сквенджером свободных радикалов [135].

Достаточно широкий ряд белков в своей структуре имеет функционально значимые остатки цистеина, способные подвергаться посттрансляционной модификации, включая окисление. Значение рК у свободного цистеина в физиологических условиях составляет 8,5, при этом его окислительная модификация невозможна. Активироваться, т.е. переходить в состояние тиолат-аниона, цистеин может в составе белковой молекулы благодаря ряду факторов, в том числе действию соседних основных аминокислотных остатков, наличию водородных связей, микроокружению остатков цистеина, связывания с субстратом [81]. Между остатком цистеина полипептидной цепи и молекулой GSH в ряде случаев может образовываться дисульфидная связь (белок-SSG), то есть происходит процесс S-глутатионилирования, защищающий белки от окислительного стресса и играющий значительную роль в регуляции активности белков и осуществлении редокс-сигнализации [96]. В ходе протекания S-глутатионилирования может изменяться способность белка к образованию дисульфидных связей, а, следовательно, и фолдинг молекулы, что отражается на её функциональном состоянии. Помимо этого, важным эффектом S-глутатионилирования является предотвращение последующего окисления образующейся из цистеина сульфеновой кислоты (Cys-SOH) в сульфиновую (Cys-SO₂H) и далее в сульфоновую (Cys-SO₃H), которая не восстанавливается в физиологических условиях [290].

Существенный вклад в регуляцию клеточных редокс-зависимых процессов вносит ГТ (КФ 2.5.1.18), формирующая суперсемейство изоформ,

представители которого катализируют конъюгацию GSH с большим числом экзо- и эндогенных неполярных соединений, содержащих электрофильные атомы углерода, азота, фосфора и серы, что обеспечивает защиту клетки от их токсического воздействия [293]. Изоферменты ГТ в настоящее время обнаружены в большинстве организмов, включая представителей позвоночных, насекомых, растений, дрожжей, аэробных бактерий. Среди ГТ выделяют три подсемейства изоформ: митохондриальные, микросомальные и цитозольные.

У млекопитающих ГТ обнаруживается практически во всех органах и тканях, наибольшая активность фермента наблюдается в печени. В клетке около 90% активности ГТ приходится на долю цитозольных форм. На основании первичной пептидной структуры цитозольные изоформы ГТ у млекопитающих разделяют на семь классов (α , μ , π , θ , ζ , ω , σ), в которые входят 17 изоформ [312].

Микросомальные формы ГТ представляют собой мембранные интегральные белки, называемые в настоящее время «мембрансвязанные белки метаболизма эйкозаноидов и глутатиона» [90]. Изоформы данного подсемейства подразделяются на 4 подгруппы (I–IV), у ферментов которых первичная структура белка сходна не более чем на 20%. У человека найдено 6 изоферментов, относящихся к I, II и IV подгруппам [90]. Микросомальные изоформы ГТ, подобно цитозольным, катализируют конъюгацию GSH с электрофильными соединениями и, помимо этого, участвуют в реакциях изомеризации ненасыщенных молекул, биосинтезе простагландинов и лейкотриенов [152].

Митохондриальной формой ГТ у человека является ГТК1-1, относящаяся к к-классу [252], её активность обнаруживается также и в пероксисомах [243]. ГТК1-1 грызунов и человека катализирует превращение достаточно широкого ряда типичных для ГТ субстратов, таких как 1-хлор-2,4-динитробензол, а у *Caenorhabditis elegans* она принимает участие в энергетическом метаболизме и обмене липидов [227].

По структуре цитозольные и митохондриальная формы ГТ представляют собой гомо- или гетеродимеры, при этом в составе гетеродимеров субъединицы относятся к одному и тому же классу. Ферменты микросомального подсемейства ГТ, в отличие от цитозольных, могут быть не только димерами, но также моно- и тримерами, а иногда встречаются мультимерные комплексы [152]. В состав каждой субъединицы включено два домена, связанных небольшим неупорядоченным участком. Участком связывания GSH является N-концевой домен (G-сайт), который обладает топологией, подобной тиоредоксину, и включает в состав три α -спирали и четыре β -складчатых слоя ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ и $\beta 4$), причем три из них расположены антипараллельно. Данные элементы белковой молекулы скомбинированы в последовательности $\beta\alpha\beta\alpha$. Участком связывания косубстрата является C-концевой домен (H-сайт), представляющий собой α -спиральный участок, включающий 5 или 6 α -спиралей ($\alpha 4-8$ или $\alpha 4-9$). Изоферменты α , θ и ω классов содержат дополнительную $\alpha 9$ -спираль в своей структуре. Представители μ -класса на C-конце обладают уникальной μ -петлей. На N-конце у изоферментов ω -класса имеется дополнительная последовательность из 19 аминокислотных остатков, а у форм ГТ θ -класса между $\alpha 4$ - и $\alpha 5$ -спиралями расположена большая петля [241]. Существенные отличия в структуре молекул разных классов ГТ обуславливают их широкую субстратную специфичность и разнообразие функций.

На основе всестороннего сравнительного анализа первичной структуры и строения цитозольных форм ГТ, в частности аминокислотного состава активного центра, их можно разделить на две подгруппы: Y-ГТ – ферменты, использующие для активации GSH остаток тирозина (α , μ , π и σ классы), и S/C-ГТ – изоформы, осуществляющие взаимодействие с GSH через сериновый (ϕ , τ , θ и ζ классы) или цистеиновый (β и ω классы) остаток [241]. У ферментов обеих подгрупп, а также у представителей митохондриальных ГТ данные аминокислотные остатки, отвечающие за активацию GSH, расположены в так называемой «каталитической петле», которая находится в

тиоредоксин-подобном домене за первым β -складчатым слоем. Как уже было отмечено, у представителей различных классов ГТ строение Н-сайта может значительно различаться.

Сборка димеров происходит посредством взаимодействия по принципу «мяч-впадина» или «ключ-замок» между доменом I одной субъединицы и доменом II соседней. В роли «ключа» выступают определенные остатки ароматических аминокислот из петли между $\alpha 3$ -спиралью и $\beta 2$ -слоем первого мономера, которые располагаются в гидрофобном «замке», формируемым углублением между $\alpha 4$ - и $\alpha 5$ спиральями второго мономера.

Помимо процессов детоксикации, важной ролью ГТ является участие в работе АОС, обусловленное способностью восстанавливать органические гидропероксиды до спиртов за счет косубстрата GSH [152].

Восстановление GSSG может осуществляться за счет действия ГР – фермента, для активности которого требуется НАДФН – необходимое соединение для рециркуляции GSH [261]. Данное вещество может синтезироваться в высоко консервативном цитоплазматическом пентозофосфатном пути, чрезвычайно важном для регуляции метаболизма в условиях оксидативного стресса во многих организмах. Нормальное функционирование этого метаболического пути является также необходимым фактором в жизнедеятельности эритроцитов – клеток, имеющих существенный риск окислительного повреждения. Установлено, что люди с недостаточностью ферментов пентозофосфатного пути предрасположены к гемолитической анемии, так как их эритроциты не способны поддерживать необходимую концентрацию GSH [92]. Кроме того, окислительный стресс может стимулировать активность пентозофосфатного пути, что было показано на ряде объектов: лимфоцитах человека [284], надпочечниках, печени и поджелудочной железы крыс [231], клетках бактерий [222].

Главными продуктами данного пути являются рибозо-5-фосфат, использующийся для биосинтеза пуриновых азотистых оснований, и

НАДФН, синтезируемый 6-фосфоглюконатдегидрогеназой и Г6ФДГ – лимитирующим ферментом пентозофосфатного пути [176]. Активность Г6ФДГ может повышаться при снижении соотношения НАДФН/НАДФ, что необходимо для поддержания пула НАДФН. Кроме того, Г6ФДГ способна активироваться в результате воздействия на клетки ряда внеклеточных окислителей [176], способствующих снижению концентрации НАДФН. Фермент имеет молекулярную массу 104-110кДа, представляет собой гомодимер, который в функциональном центре в положении 169 имеет остаток лизина, существенно влияющий на каталитическую активность Г6ФДГ. Известно, субстрат фермента, НАДФ, принимает участие в стабилизации и поддержании активного состояния молекулы, в то время как НАДФН является сильным ингибитором Г6ФДГ, способствующим диссоциации димера. Кроме этого, ингибиторами фермента могут служить такие соединения, как АТФ и 2,3-бисфосфолицерат [41].

Еще одним поставщиком НАДФН является НАДФ-ИДГ [138] – широко распространенный фермент, найденный у многих организмов: от дрожжей до человека, локализованный в цитоплазме, митохондриях или пероксисомах [189]. Митохондриальная форма фермента отличается от НАД-ИДГ, которая является компонентом цикла Кребса. Тем не менее, как и НАД-ИДГ, НАДФ-ИДГ катализирует реакцию декарбоксилирования изоцитрата до 2-оксоглутарата [151], что может происходить в митохондриях, цитоплазме или пероксисомах с использованием изоцитрата, транспортированного сквозь митохондриальную мембрану. Благодаря этому, НАДФН может образовываться в клеточных компартментах без надобности использования активного транспорта данной молекулы сквозь мембрану [94].

Мутации гена ИДГ сопряжены у людей с развитием такого заболевания, как глиобластома [224]. В зависимости от кофактора данные ферменты подразделяются на НАД- и НАДФ-зависимые. Существуют данные, что НАД-ИДГ представляют собой октамеры, в то время как НАДФ-ИДГ являются мономерами или димерами, причем в случае димера

аминокислотные остатки обеих субъединиц формируют активный центр, тогда как у мономерной формы фермента он сосредоточен в пределах одной полипептидной цепи.

В ходе ряда исследований димерные НАДФ-ИДГ [91] были подразделены на две группы: подсемейство I (S1-ИДГ) и подсемейство II (S2-ИДГ), при этом к подсемейству III (S3-ИДГ) были отнесены НАД-ИДГ. Вместе с тем, зависимость от определенного кофактора не является для ИДГ монофилетическим свойством, таким образом НАД-ИДГ может быть представлена во всех подсемействах фермента и выступает предком всех димерных ИДГ. Помимо этого, в подсемействе III отсутствует НАДФ-ИДГ, а все мономерные формы фермента используют НАДФ в качестве кофактора [201]. S1-ИДГ найдены у прокариот, представляют собой гомодимерные формы фермента с двумя активными центрами, проявляющие активность в растворимой димерной форме. Представители данного подсемейства являются, главным образом, НАДФ-зависимыми, [98], но встречаются и НАД-зависимые формы [287]. ИДГ подсемейства II также являются гомодимерами, схожи по структуре и функциям с S1-ИДГ, но имеют иную аминокислотную последовательность. Представителями данного семейства являются преимущественно эукариотические ИДГ, включая цитоплазматическую ИДГ человека [288]. К подсемейству II принадлежат также ферменты ряда бактерий [286].

НАДФ-ИДГ эукариот участвуют в биосинтетических процессах [101], а также реализации защитных механизмов от окислительного стресса [272]. В клетках эукариот имеется, по меньшей мере, два вида НАДФ-ИДГ: цитоплазматические и митохондриальные.

1.2.2. Неферментативное звено антиоксидантной системы

1.2.2.1. Водорастворимые антиоксиданты

В состав группы низкомолекулярных антиоксидантов входит широкий ряд соединений, способных предотвращать окислительное повреждение посредством прямого взаимодействия с АФК, либо опосредованно [177]. В последнем случае имеет место механизм, включающий хелатирование ионов металлов переменной валентности, что способствует торможению реакций Фентона и Хабера-Вайса. При прямом воздействии на АФК низкомолекулярные антиоксиданты выступают в качестве доноров электронов и восстанавливают радикалы, защищая таким образом клеточные структуры от разрушения. По сравнению с ферментативными, неферментативные антиоксиданты обладают рядом преимуществ. Так, обладая относительно небольшими размерами, они проникают через клеточные мембраны и локализуются в непосредственной близости от своих мишеней, характеризуются широким спектром активности по отношению к различным радикалам. Клетка, в свою очередь, может достаточно быстро изменять концентрацию низкомолекулярных антиоксидантов. Источником данных соединений могут выступать как эндогенные биосинтетические процессы, так и экзогенные вещества, полученные с пищей. В ходе детоксикации АФК молекулы антиоксидантов окисляются, образуя малоактивные радикалы антиоксидантов. Данные радикалы затем могут подвергнуться дальнейшему окислению, либо регенерации с использованием определенного восстановительного эквивалента. Несмотря на то, что антиоксидантам отведена одна из ключевых ролей в поддержании клеточных функций, сама клетка производит их в весьма ограниченном количестве. При этом ни один эндогенно синтезированный антиоксидант не выполняет только лишь функцию защиты от окислительного стресса. Данные соединения обладают рядом других важных биологических функций, в связи с чем, необходимо поступление низкомолекулярных антиоксидантов в организм с

пищей. Низкомолекулярные антиоксиданты можно подразделить на водорастворимые и жирорастворимые. Одним из важнейших водорастворимых антиоксидантов является аскорбиновая кислота, синтезируемая растениями и некоторыми животными. Фермент, необходимый для её синтеза, у человека утрачен, данное соединение может поступать только с пищей. Как и другие низкомолекулярные антиоксиданты, аскорбат, существующий при физиологическом рН в виде моноаниона, обладает широким рядом биологических функций. В частности, он является кофактором для ферментов, таких как пролилгидроксилаза и дофамин- β -гидроксилаза. Антиоксидантный эффект витамина С обусловлен его способностью отдавать 2 электрона, восстанавливая и нейтрализуя свободные радикалы. При этом, отрыв одного электрона приводит к превращению аскорбата в аскорбил-радикал, окисляющийся в дальнейшем до дегидроаскорбата. Аскорбил-радикал представляет собой относительно стабильное соединение и способен регенерировать в аскорбиновую кислоту путем присоединения электрона от восстановительного эквивалента, в частности GSH или НАДН, с помощью фермента НАДН-семидегидроаскорбатредуктазы. Конечный продукт окисления – дегидроаскорбат, также может регенерировать под действием фермента дегидроаскорбатредуктазы в присутствии 2 молекул GSH. Аскорбиновая кислота является эффективным гасителем большинства известных АФК, участвует в восстановлении окисленного токоферола, однако её функции к настоящему времени до конца не выяснены. Вместе с тем, для аскорбата характерна и прооксидантная активность. Так, его взаимодействие с ионами трехвалентного железа может сопровождаться генерированием OH^{\bullet} [148]. К важнейшим низкомолекулярным антиоксидантам плазмы крови относится мочева кислота. Её синтез происходит за счет ферментов ксантинооксидазы и ксантиндегидрогеназы из гипоксантина и ксантина [73]. В физиологических условиях мочева кислота в растворе присутствует в виде иона, что обуславливает её антиоксидантный эффект. Данное соединение способно

взаимодействовать с OH^\bullet , $^1\text{O}_2$, RO_2^\bullet , ONOO^- , H_2O_2 и оксигемоглобином, образуемым в ходе протекания процессов ПОЛ [148]. Кроме того, мочевиная кислота хелатирует ионы таких металлов, как железо и медь, препятствуя их участию в процессах образования АФК [67]. Известно также, что данное соединение блокирует деградацию СОД3 [245]. В число низкомолекулярных антиоксидантов входят также гистидиновые дипептиды, образующиеся в мозге и скелетной мускулатуре, такие как анзерин, карнозин и гомокарнозин [62]. Подобные вещества эффективно нейтрализуют большинство видов АФК и считаются мультифункциональными антиоксидантами, снижают окислительное повреждение *in vivo* при различных патологиях, включая ишемию. Кроме того, прооксидантный эффект для гистидиновых дипептидов не характерен [291].

1.2.2.2. Жирорастворимые низкомолекулярные антиоксиданты

Важнейшим представителем жирорастворимых антиоксидантов является витамин Е – токоферол. Данную группу соединений, способных ингибировать процессы ПОЛ, составляют восемь природных веществ – представителей семейства витамина Е. В своей структуре данные соединения имеют 3 асимметрических атома углерода, что обуславливает существование 8 оптических изомеров. Наибольшей антиоксидантной активностью обладает α -токоферол. Витамин Е после взаимодействия с АФК превращается в токоферолхинон, а затем в токоферилхинон. Окисленные формы антиоксиданта, в свою очередь, способны восстанавливаться до активной формы с участием молекул аскорбиновой кислоты. Важным свойством токоферолов является также их способность проявлять мембраностабилизирующее действие. Однако, в присутствии металлов с переходной валентностью витамин Е может проявлять прооксидантные свойства [137]. К жирорастворимым антиоксидантам относится также витамин А, представляющий собой широкую группу веществ, включая ретинол,

ретиаль, ретиновую кислоту и каротиноиды, ключевым из которых является β -каротин [89]. Витамин А обладает прямым антиоксидантным эффектом, а также способен оказывать косвенное воздействие, выражающееся в ингибировании транскрипции гена iNOS в различных тканях, способствуя снижению генерации оксида азота [309]. Антиоксидантный эффект каротиноидов связан с инактивацией $^1\text{O}_2$, после взаимодействия с которым данные соединения переходят в триплетное состояние, после чего рассеивают свою энергию посредством вращательных и колебательных взаимодействий с молекулами растворителя [179]. Вещества группы витамина А могут также нейтрализовывать продукты ПОЛ. Существует три основных способа детоксикации радикалов каротиноидами: непосредственно присоединение молекулы радикала, отщепление протона и перенос электрона [180]. Известно также, что прием в пищу продуктов, содержащих каротиноиды, снижает вероятность развития рака в ротовой полости, глотке, гортани и пищеводе. Антиоксидантными свойствами обладает также α -липоевая, или тиоктовая кислота, выполняющая роль кофактора в важнейших митохондриальных дегидрогеназных реакциях. Известно, что данная кислота способна реагировать с такими АФК, как OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, RO_2^\bullet , NOCl , $^1\text{O}_2$. Помимо этого, тиоктовая кислота участвует в защите клеточных мембран, от повреждения, взаимодействуя с GSH и витамином С. Помимо антиоксидантной активности, у восстановленной формы кислоты – дигидролипоата, может наблюдаться прооксидантная активность, выражающаяся в способности восстанавливать железо. В ряде работ было выявлено, что введение α -липоевой кислоты на фоне окислительного стресса позитивно влияет на состояние окислительного метаболизма тканей, что было показано при таких состояниях, как нейродегенеративные, ишемические и лучевые поражения, катаракта, диабет. Тиоктовая кислота может также выступать в качестве редокс-регулятора белков, в частности миоглобина, тиоредоксина, пролактинина [248].

1.3. Характеристика мелатонина

1.3.1. Синтез мелатонина в организме

Мелатонин, или N-ацетил-5-метокситриптамин, представляет собой широко распространенный гормон, синтезирующийся у большинства живых организмов. У человека и других позвоночных биосинтез мелатонина происходит в эпифизе, клетках диффузной эндокринной системы пищеварительного тракта (хромаффинных клетках печени), сетчатой оболочке глаза и др. Впервые данный гормон был выделен из экстракта шишковидной железы быка [168]. Мелатонин обладает широким рядом биологических функций, в частности регуляцией суточных ритмов, иммунорегулирующей, антиоксидантной, онкостатической активностью [209]. Предшественником мелатонина у человека является триптофан, превращающийся под действием фермента триптофангидроксилазы в 5-гидрокситриптофан, подвергающийся декарбоксилированию с образованием серотонина. Синтез мелатонина из серотонина происходит под действием ферментов арилалкиламин-N-ацетилтрансферазы, превращающей серотонин в N-ацетил серотонин, и гидроксииндол-O-метилтрансферазы, преобразующей последний непосредственно в мелатонин [65]. У млекопитающих шишковидная железа является нейроэндокринным преобразователем. Так, сигнал от сетчатки глаза через супрахиазматическое ядро гипоталамуса и симпатическую нервную систему передается на эпифиз. Информация железе от нейронов поступает в виде норэпинефрина, что ведет к секреции мелатонина. Синтез и выделение гормона в кровь стимулируется в темноте и ингибируется на свету. В светлое время суток клеточные мембраны фоторецепторов сетчатки глаза гиперполяризованы, и выделение норадреналина заблокировано [133]. С наступлением темноты норадреналин начинает секретироваться фоторецепторами, активируя всю систему, что способствует к возрастанию числа $\alpha 1$ и $\beta 1$ адренорецепторов эпифиза [251]. В результате этого увеличивается активность арилалкиламин-N-

ацетилтрансферазы в 30-70 раз и, следовательно, усиливается синтез и секреция мелатонина. После биосинтеза гормон поступает в кровь посредством пассивной диффузии, секреция мелатонина усиливается после наступления темноты и достигает максимума в середине ночи (от 2 до 4 часов). Содержание мелатонина в крови сильно зависит от возраста: у грудных детей гормон обнаруживается в следовых количествах, а пик его секреции приходится на 4 и 7 летний возраст, когда его концентрация может достигать 325 пг/мл [64]. В последующем уровень мелатонина постепенно уменьшается и достигает к 15-18 годам показателей взрослого организма – 10-60 пг/мл. На протяжении зрелого возраста концентрация гормона остается стабильной, но к старости постепенно снижается [95]. Выделяют три основных метаболических пути превращения мелатонина. Первый – классический путь распада в печени, где образуется 6-гидроксимелатонин [99]. Альтернативный, индольный путь, протекает с формированием 5-метоксииндол уксусной кислоты или 5-метокситриптофола [143]. Продуктом же третьего, кинураминового пути, является N1-ацетил-N2-формил-5-метилкинурамин (АФМК) [206]. В процессе распада мелатонина по классическому пути гормон превращается в 6-гидроксимелатонин под действием цитохрома P450 в печени [217], а затем конъюгируется с глюкуроновой и серной кислотами и экскретируется с мочой. Интенсивность выведения 6-гидроксимелатонин сульфата с мочой тесно коррелирует с содержанием в крови мелатонина [104]. Кроме того, в печени также возможно деметилирование данного гормона с образованием N-ацетилсеротонина [99]. Мелатонин действует на клетку мембранно-опосредованно, с участием рецепторов, относящихся к семейству G-белков. Выделяют два класса мембранных рецепторов – MT1, кодируемый геном MTNR1A, и MT2, кодируемый геном MTNR1B [226]. Гомология данных рецепторов может составлять до 55%, а их мембранных доменов – до 70% [223]. Рецепторы мелатонина, как и ряд других G-белок-сопряженных рецепторов, обладают способностью подвергаться гликозилированию их

внутриклеточного N-концевого участка, а также фосфорилированию C-концевого участка внутренней стороны мембраны, подобно протеинкиназе А, протеинкиназе С и казеинкиназе [114]. Рецептор МТ1 связан с различными группами G-белка, опосредующими ингибирование аденилатциклазы и активацию фосфолипазы С. Помимо этого, связывание мелатонина с данными рецепторами способствует торможению цАМФ-зависимого пути, что осуществляется посредством уменьшения активности протеинкиназы А и фосфорилирования ядерного фактора CREB (cAMP response element-binding protein) [113]. Экспрессия рецепторов МТ1 характерна для клеток головного мозга, сердечно-сосудистой системы (включая аорту, сердце и периферические кровеносные сосуды), семенников, яичников, иммунной системы, печени, кожи, коры надпочечников, почек, сетчатки глаз, плаценты, селезенки, поджелудочной железы [203]. В головном мозге экспрессия МТ1 характерна, в первую очередь, для мозжечка, гипоталамуса, гиппокампа, вентральной области покрышки и черной субстанции. Активация рецептора МТ2 опосредует ряд сигнальных путей, включая образование фосфоинозиотида, ингибирование аденилатциклазы и торможение гуанилатциклазного пути. Такие рецепторы характерны для клеток иммунной системы, сетчатки глаза, головного мозга (супрахиазматическое ядро, гипоталамус,), кровеносных сосудов, почек, семенников, желудочно-кишечного тракта, жировой ткани, молочных желез, кожи. Помимо МТ1 и МТ2, был найден рецептор мелатонина МТ3, обладающий более низким сродством к мелатонину и гомологичный на 95% с человеческой хинонредуктазой 2 – цитоплазматическим ферментом, катализирующим восстановление хинонов, включая кофермент Q и менадион [162]. Мелатонин также выступает в роли лиганда для ретиноид-зависимых орфаных ядерных рецепторов [256]. Данный гормон способен взаимодействовать с внутриклеточными белками, такими как кальмодулин, тубулин, кальретикулин [83], и блокировать связывание Ca^{2+} с кальмодулином [75]. По-видимому, эти эффекты связаны с физиологической

ролью мелатонина, однако достоверных подтверждений этому пока не найдено.

1.3.2. Биологическая роль мелатонина в организме

Среди ключевых функций мелатонина в организме можно выделить антиоксидантную, заключающуюся в способности гормона как непосредственно, так и косвенно обезвреживать свободные радикалы, уменьшая тем самым интенсивность ПОЛ и деградацию ДНК. Данный гормон представляет собой антиоксидант широкого спектра действия, обладающий способностью активировать цитопротекторные ферменты [267]. Ряд защитных свойств гормона обусловлен продуктом его метаболизма – АФМК [238]. Выявлено, что введение мелатонина на фоне таких состояний, как сепсис, асфиксия и хирургические вмешательства, способствовало уменьшению концентрации малонового диальдегида, провоспалительных цитокинов и соотношения нитрат/нитритов. Кроме того, мелатонин приводил к торможению апоптоза нейронов на фоне хронической невропатии, характерной для болезни Альцгеймера, Хантингтона, Паркинсона и бокового амиотрофического склероза. При этом отсутствовали побочные эффекты при применении гормона в диапазоне дозировок 1-300 мг в день [264]. Было показано, что при выделении мелатонина в кровь или внеклеточную жидкость уменьшается активность формирования и прогрессирования опухоли [225]. При введении гормона в физиологических и фармакологических концентрациях, наблюдался эффект угнетения роста MCF- и эстроген-позитивных линий клеток рака молочной железы. Причем, как было показано на культуре клеток, действие мелатонина связано с увеличением уровня глутатиона [225]. Данный гормон оказывал противоопухолевый эффект и в отношении рака печени, что, по-видимому, было опосредовано MT1/MT2-зависимым ингибированием всасывания жирных кислот, включая линолевую – предшественника митогенной 13-

гидроксиоктадекадиеоновой кислоты [77]. Онкостатическое действие мелатонина было продемонстрировано также на клеточных линиях рака эндометрия [110], рака яичников [299], опухоли кишечника [618. – P. 1549–1553] и предстательной железы [210]. Вместе с тем, в некоторых случаях гормон может способствовать росту опухоли [60]. Известна иммуномодулирующая активность мелатонина. Показано, что угнетение его синтеза приводит у мышей к ослаблению иммунного клеточного и гуморального ответов [194]. Введение же данного гормона препятствует развитию вторичных иммунодефицитов, индуцированных стрессом или лекарственными препаратами, и защищает мышей от вируса энцефалита [195]. Показано защитное действие мелатонина по отношению к кроветворным клеткам-предшественникам в условиях токсического действия химиотерапевтических препаратов [193], активация выработки ИЛ-2 и ИЛ-6 в культуре мононуклеарных клеток [205] и ИЛ-2 и ИЛ-12 макрофагами [202]. По-видимому, гормон оказывает прямое влияние на регуляцию иммунной системы, о чем можно судить по наличию специфических мелатонин-связывающих участков в лимфоидных клетках [120]. В настоящее время представляется перспективным применение мелатонина в терапии сердечно-сосудистых заболеваний, как отдельно, так и в комбинации с другими лекарственными препаратами. В ходе ряда экспериментальных работ было показано влияние данного гормона на систему кровообращения посредством различных механизмов. Так, благодаря своим антиоксидантным эффектам, мелатонин улучшает функцию эндотелия посредством поддержания доступности монооксида азота (NO), регулируя таким образом вазодилатацию и уменьшение артериального давления [279]. Данный гормон также способен понизить адренергический и увеличить холинергический тонус [88]. Результаты этих исследований, наличие MT1 и MT2 рецепторов мелатонина в левом желудочке, аорте, коронарных, церебральных и системных периферических артериях [298], а также подверженность лиц с измененным циркадным ритмом развитию сердечно-сосудистых патологий,

позволяет говорить о возможной фармакологической роли гормона в терапии сердечно-сосудистых заболеваний, включая ишемию миокарда, гипертонию и инсульт. Помимо прочего, продемонстрирован регулирующий эффект мелатонина на изменение массы тела. Так, ежедневное применение данного гормона снижает массу жировой ткани в области брюшины и концентрацию лептина в плазме крови крыс [102]. В экспериментах на животных также показано, что мелатонин способен предотвращать ряд побочных эффектов ожирения, в том числе резистентность к инсулину [211]. Таким образом, снижение выработки мелатонина с возрастом может приводить к возникновению метаболических нарушений, ассоциированных с повышением массы тела и ожирением [103].

1.3.3. Вещества, корригирующие уровень мелатонина

1.3.3.1. Мелаксен

Мелаксен представляет собой наиболее популярный мелатонин-корригирующий препарат, являющийся по структуре синтетическим аналогом мелатонина. Синтезирован мелаксен из аминокислот растительного происхождения, его основной эффект заключается в нормализации биологических ритмов, оказании адаптогенного, седативного и снотворного действий, адаптации организма к быстрой смене часовых поясов. Препарат применяют также для нормализации ночного сна (ускорение засыпания, уменьшение количества ночных пробуждений, улучшение качества сна и самочувствия после утреннего пробуждения). Установлено позитивное действие мелаксена на интеллектуально-мнестические функции мозга и эмоционально-личностную сферу, способность понижать стрессовые реакции путем увеличивая содержания в среднем мозге и гипоталамусе гамма-аминомасляной кислоты и серотонина, что приводит к изменению активности пиридоксалькиназы [31]. Выявлены также иммуностимулирующие и антиоксидантные эффекты мелаксена. Препарат

оказывает протекторное действие по отношению к ДНК и белкам в условиях окислительного стресса, тормозит процессы ПОЛ, стимулирует секрецию интерлейкинов и γ -интерферона лимфоцитами, участвует в регуляции противоопухолевого иммунитета, способствует замедлению процессов патологических изменений клеток. Обладая антиоксидантными, иммуномодулирующими и ритмрегулирующими эффектами, способен замедлять старение клеток. Снижает выделение гонадотропина и, в меньшей степени, других аденогипофизарных гормонов – кортикотропина, соматотропного и тиреотропного гормонов [1].

1.3.3.2. Эпифамин

Эпифамин – препарат с мелатонин-корректирующей активностью, полученный из шишковидной железы крупного рогатого скота, в состав которого входит комплекс белков и нуклеопротеидов, обладающих избирательным действием на клетки эпифиза. В клинической практике эпифамин используют с целью нормализации гормонального обмена, регуляции иммунной и свертывающей системы крови, а также для поддержания функции эндокринной системы у пожилых людей. Препарат используется также в терапии некоторых онкологических заболеваний, таких как рак молочной железы и шейки матки. Применяется эпифамин также в качестве средства, стимулирующего иммуно- и гемопоэз, а также с целью подготовки к последующему комплексному лечению. Препарат стимулирует кроветворную и иммунную функции у пациентов с гормонзависимыми опухолями на фоне лучевой и химиотерапии, уменьшая риск инфекционных и ряда других осложнений. Перспективным представляется также применение эпифамина при лечении бронхиальной астмы, сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета и патологий, сопряженных с развитием психовегетативных расстройств [21, 43].

1.3.3.3. Вальдоксан

Характерным проявлением депрессии является нарушение сна. Наиболее перспективными препаратами для лечения депрессивных расстройств могут являться антидепрессанты, способные эффективно корректировать нарушения сна [184]. Идеальный антидепрессант должен не только способствовать легкому засыпанию и пробуждению, но также обеспечивать в течение дня чувство бодрости и концентрацию внимания [182]. Среди таких соединений можно выделить агомелатин – вальдоксан, представляющий собой нафталинсодержащее соединение, являющееся селективным агонистом мелатониновых рецепторов MT1 и MT2, а также антагонистом рецепторов серотонина 5-HT2C. Вальдоксан, наряду с этим, не обладает сродством к адренергическим, мускариновым, дофаминергическим и гистаминергическим рецепторам [79]. Период полураспада данного соединения в организме человека составляет более 2 часов – больше, чем у мелатонина. Метаболизм вальдоксана осуществляется в печени под действием трех изоферментов цитохрома P450 – CYP1A1, CYP2A2 и CYP2C9. Его основными метаболитами являются 3-гидрокси-, 3-гидрокси-, 7-метокси-, 7-десметил- и дигидродиолвальдоксан. Вальдоксан проявляет выраженный антидепрессивный эффект, что может быть обусловлено особенностью экспрессии рецепторов MT1, MT2, а также 5-HT2C рецепторов в супрахиазматическом ядре и других областях мозга, вовлеченных в патофизиологию депрессии – гиппокампе, коре головного мозга, таламусе и миндалевидном теле. Регуляция этих рецепторов осуществляется биологическими часами, зависит от степени освещенности и характеризуется циркадными колебаниями [198]. Действие вальдоксана на данные рецепторы приводит к ресинхронизации нарушенных циркадных ритмов и фаз сна. Такой эффект препарата может обеспечивать эффективность его применения в терапии депрессивных состояний, включая

клиническую депрессию, пограничное расстройство личности и сезонное аффективное расстройство [174].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс (*Rattus norvegicus*) массой 200-250 г, содержащихся в условиях 12-часового светового дня, комнатной температуры и доступа к воде и пище *at libitum*.

Все процедуры, осуществляемые в ходе работы с животными, проводились в соответствии с правилами по устройству и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (УК РФ ст. 245).

2.2. Характеристика тестируемых препаратов

В качестве исследуемого препарата был выбран мелаксен, являющийся по структуре синтетическим аналогом мелатонина. Данное средство применяют обычно для нормализации биологических ритмов, при необходимости оказании седативного и снотворного действий, адаптации организма к смене часовых поясов, нормализации ночного сна. Другим тестируемым препаратом был эпифамин, получаемый из шишковидной железы крупного рогатого скота и содержащий в своем составе комплекс белков и нуклеопротеидов, обладающих избирательным действием на клетки эпифиза. Терапию эпифамином назначают с целью нормализации гормонального обмена, поддержания у пожилых людей функции эндокринной системы, а также для коррекции работы иммунной и свертывающей системы крови.

2.3. Методы исследования

2.3.1. Моделирование ишемии/реперфузии головного мозга у крыс

Индукцию ИРГМ у животных экспериментальных групп осуществляли под кетаминowym наркозом с помощью 30-минутной окклюзии общих сонных артерий с последующим снятием окклюдоров. Контроль восстановления кровоснабжения проводили визуально, основываясь на изменении цвета и пульсации артерий [20]. Животных подвергали умерщвлению спустя 72 часа после моделирования патологии. Кровь забирали из сердца, головной мозг извлекали из черепной коробки по стандартной методике.

Животные в ходе исследования были разделены на пять экспериментальных групп: 1-ая группа (n=22) – ложнооперированные животные; 2-ая группа (n=31) – крысы с ИРГМ; в 3 и 4 группах (n = 15) животные с ИРГМ подвергались внутрибрюшинным инъекциям мелаксена в 1 мл физиологического раствора утром, в дозах 5 и 10 мг/кг в течение трех суток; в 5 и 6 группах (n = 16) животным аналогичным образом вводили эпифамин трижды в сутки в дозах 1,25 и 2,5 мг/кг; 7 и 8 группы (n=10) были представлены содержащимися на стандартном режиме вивария крысами, которым вводили мелаксен в дозе 10 мг/кг и эпифамин в дозе 2,5 мг\кг по вышеуказанным схемам.

2.3.2. Подготовка материала для биохимических исследований

После вскрытия черепной коробки мозг несколько раз промывали ледяным физиологическим раствором, затем осушали фильтровальной бумагой и взвешивали. Для приготовления гомогената головного мозга осуществляли его растирание с помощью гомогенизатора Daihan HG-15A в 3х-кратном объеме охлажденной среды выделения, содержащей 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 7,8, 10 мМ ЭДТА, 0,5 мМ β -меркаптоэтанол.

Полученную после гомогенизации головного мозга субстанцию фильтровали через слой капрона с квадратными ячейками (0,1 мм) и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин для отделения неразрушенных тканевых структур. В ходе дальнейшей работы использовали супернатант.

Венозную кровь набирали в чистую стеклянную пробирку без антикоагулянта и инкубировали 30 минут при температуре 37⁰С, после расслаивания фаз отбирали супернатант и центрифугировали его при 3000g в течение 10 мин. Полученную сыворотку крови использовали для дальнейшего исследования.

2.3.3. Оценка уровня мелатонина по содержанию мелатонинсульфата у крыс

Концентрацию мелатонинсульфата в моче крыс исследовали иммуноферментным методом с применением набора реактивов Rat melatonin sulfate ELISA Kit (“MyBiosource, Inc.”, США).

2.3.4. Определение содержания лактата в головном мозге крыс

Содержание лактата определяли с применением диагностического набор фирмы «Витал» (Россия), принцип метода которого заключается в формировании под действием лактатоксидазы и пероксидазы окрашенного комплекса, поглощающего при 505 нм.

2.3.5. Измерение активности ферментов

Ферментативную активность в образцах животных экспериментальных групп представляли в Е на грамм сырой массы ткани мозга, Е на мл сыворотки и в виде удельной активности. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее

образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин при температуре 25°C. Активность ферментов измеряли на спектрофотометре Hitachi U-1900 с программным обеспечением.

2.3.5.1. Определение активности ферментов, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАД и НАДФ

О скорости протекания реакций, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАД или НАДФ, судили по изменению оптической плотности при 340 нм [50]. Расчет активностей ГП, ГР, Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ производили по следующей формуле:

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

где D – изменение оптической плотности при 340 нм за определенное время; 1,0 – объем раствора в кювете, мл; V – общий объем ферментного раствора, мл; ΔV – объем внесенной для измерения пробы, мл; t – время измерения, мин; 6,22 – коэффициент экстинкции для дегидрогеназ, соответствующий величине поглощения, которую дает 1 мкмоль кофермента, находящийся в 1 мл исследуемой смеси при измерении на спектрофотометре, когда толщина слоя измеряемого раствора составляет 1 см.

2.3.5.1.1. Определение активности глутатионпероксидазы

Скорость ГП-реакции измеряли, основываясь на падении оптической плотности растворов опытных образцов при 340 нм, происходящей в ходе окисления НАДФН в процессе протекания сопряженных ферментативных реакций: окисления GSH под действием ГП и его последующего восстановления, взаимосвязанного с окислением НАДФН в ГР-реакции. Анализ активности ГП проводили в среде спектрофотометрирования, содержащей 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ НАДФН, 0,85 мМ GSH, 0,37 мМ H₂O₂, 1 ед/мл ГР. Контрольная проба не содержала GSH [50].

2.3.5.1.2. Определение активности глутатионредуктазы

Скорость ГР-реакции оценивали по уменьшению оптической плотности растворов опытных образцов при 340 нм вследствие окисления НАДФН, происходящего в процессе протекания реакции восстановления GSSG под действием ГР. Активность ГР измеряли в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 1мМ ЭДТА, 0,16 мМ НАДФН и 0,8 мМ GSH [18].

2.3.5.1.3. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

Скорость Г6ФДГ-реакции, сопряженной с восстановлением НАДФ в процессе превращения глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконолактон, измеряли по возрастанию оптической плотности растворов опытных образцов при 340 нм. Среда спектрофотометрирования состояла из 50мМ трис-НСl – буфера (рН 7,8), содержащего 3,2 мМ глюкозо-6-фосфат, 0,25 мМ НАДФ, 1,0 мМ $MnCl_2$. Реакцию запускали внесением в кювету опытного образца [22].

2.3.5.1.4. Определение активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы

Активность НАДФ-ИДГ оценивали по возрастанию оптической плотности в ходе восстановления НАДФ при окислительном декарбоксилировании изоцитрата. Скорость реакции измеряли в среде спектрофотометрирования, состоящей из 50 мМ трис-НСl буфера (рН 7,8), содержащего 1,5 мМ изоцитрата, 2 мМ $MnCl_2$, 0,4 мМ НАДФ [14].

2.3.5.2. Определение активности глутатионтрансферазы

Скорость ГТ-реакции измеряли по увеличению оптической плотности растворов опытных образцов при 340 нм. В качестве субстрата для анализа активности фермента использовали 1-хлор-2,4-динитробензол.

В качестве среды для анализа активности ГТ использовали 0,1 М калий-фосфатный-буфер (рН 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1мМ 1-Cl-2,4-динитробензол, 5 мМ GSH [142].

Расчет активности фермента производили по формуле:

$$E = \frac{D \times 1,0 \times V}{\Delta V \times t \times 9,6}, E \quad (2)$$

где D – прирост оптической плотности при 340 нм за определенное время; 1,0 – объем раствора в кювете, мл; V – общий объем ферментного раствора, мл; ΔV – объем внесенной для измерения пробы, мл; t – время измерения, мин; 9,6 – коэффициент экстинкции для глутатион-1хлор-2,4-динитробензола, соответствующий величине поглощения, которую дает 1 мкмоль соединения, находящийся в 1 мл исследуемой смеси при измерении на спектрофотометре, когда толщина слоя измеряемого раствора составляет 1 см.

2.3.5.3. Определение активности аконитатгидратазы

Активность АГ оценивали спектрофотометрически при 233 нм. Скорость реакции измеряли по возрастанию оптической плотности, обусловленному образованием из цитрата цис-аконитата, содержащего в своей структуре двойную связь. Для анализа АГ использовали среду спектрофотометрирования, состоящую из 50 мМ трис-HCl-буфера, рН 7,8, содержащего 0,15 мМ цитрат. Реакцию запускали добавлением исследуемой пробы в кювету [7]. Активность рассчитывали по формуле:

$$E = \frac{\Delta D \times V \times V_1}{\varepsilon \times t \times V_2}, E \quad (3)$$

где ΔD – изменение оптической плотности пробы в единицу времени измерения t ; V - общий объём ферментного раствора, мл; V_1 - объём реакционной среды, используемой для измерения активности фермента, мл; V_2 - объём ферментного раствора, внесённый для измерения, мл; ε - коэффициент молярной 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); t - время измерения активности фермента, мин.

2.3.5.4. Определение активности супероксиддисмутазы

Активность СОД исследовали спектрофотометрически при длине волны 540 нм. О скорости реакции судили по интенсивности ингибирования восстановления тетразолия нитросинего в неэнзимотической системе феназинметасульфата и НАДН [30].

Для анализа активности СОД использовали среду спектрофотометрирования состоящую из 0,1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,8), содержащего 0,33 мМ ЭДТА; 0,41 мМ нитросинего тетразолия; 0,01 мМ ФМС; 0,8 мМ НАДН. Исследуемый образец добавляли из расчёта 0,03 мл на 1 мл среды инкубации. Реакцию запускали внесением НАДН, измеряли возрастание оптической плотности в течение 5 минут.

За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимого для 50% ингибирования восстановления нитросинего тетразолия. Расчёт осуществляли по формуле:

$$\frac{100 - \frac{E_0 \times 100}{E_k}}{50 \times [\text{мг белка}]}, E \quad (4)$$

где E_0 и E_k - среднее значение прироста экстинкции за 5 минут в опытной и контрольной пробах соответственно.

2.3.5.5. Определение активности каталазы

Измерение активности каталазы производили спектрофотометрически при длине волны 410 нм. Метод основан на способности H_2O_2 образовывать стойкий окрашенный комплекс с молибдатом аммония, поглощающий при 410 нм [13].

Реактивы для проведения анализа: 0,08% раствор H_2O_2 ; 4,5% раствор аммония молибденовокислого; 0,1 М трис-НСl-буфер, рН 7,4; 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

$$A = \frac{(E_k - E_0) \times 1,0 \times 10^4 \times 4,1 \times 10^6}{22,2 \times 10^6 \times 3}, E \quad (5)$$

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 экстинции H_2O_2 ;

3 минуты – время инкубации.

2.3.6. Оценка уровня транскриптов генов

2.3.6.1. Выделение тотальной РНК

Экстракцию тотальной клеточной РНК осуществляли с помощью реагента «ExtractRNA» (Евроген, Россия) в соответствии с прилагаемым протоколом. Качество выделенной РНК анализировали путем электрофореза образцов в 1,5% агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Визуализацию результатов проводили на трансиллюминаторе при длине волны 365 нм. Измерение концентрации РНК производили на спектрофотометре UV Solar PD 2201 В (Беларусь) при длине волны 260 нм.

2.3.6.2. Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция

Синтез первой цепи комплементарной ДНК осуществляли с помощью рекомбинантной обратной транскриптазы вируса мышинового лейкоза Молони – M-MuLV. В качестве затравки применяли смесь праймеров олиго-(dT)₁₅ и Random (dN)₁₀ в соотношении 1:1, что обеспечивает избирательную трансформацию в форму ДНК только тех участков матричной РНК, которые являются транскриптами экспрессируемых генов. Для предотвращения разрушения молекул РНК в пробирки добавляли ингибиторы РНКаз. Обратную транскрипцию проводили при температуре 40 °С на протяжении 40 минут, после чего прогревали пробирки 10 минут при 80 °С для инактивации M-MuLV ревертазы. Перед проведением реакции обратной транскрипции осуществляли отжиг праймеров на РНК при 70 °С в течении 10 мин, после чего охлаждали реакционную смесь до 0 °С. Образованные после обратной транскрипции продукты использовали в качестве матрицы для постановки полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). В качестве контроля реакции использовали реакционную смесь, не содержащую обратную транскриптазу.

Для амплификации анализируемых участков генов с помощью программного обеспечения «Universal ProbeLibrary Assay Design Center» (https://lifescience.roche.com/global_en/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center) был подобран комплект генспецифических праймеров. Специфичность отжига праймеров оценивали с использованием программы «Blast» (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Праймеры по предоставленным последовательностям были синтезированы компанией ЗАО «Евроген» (Россия).

Таблица 2.

Праймеры генов, использованных для проведения ПЦР

Обозначение транскрипта	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>SOD1</i>	CCAGCGGATGAAGAG AGG	GGACACATTGGCCAC ACC
<i>CAT</i>	CAGCGACCAGATGAA GCA	GGTCAGGACATCGG GTTTC
<i>GPX1</i>	TTTCCCGTGCAATCAG TTC	GGACATACTTGAGG GAATTCAGA
<i>GSR</i>	TTCCTCATGAGAACCA GATCC	CTGAAAGAACCCATC ACTGGT
<i>NRF2</i>	GCCTTGTA CTTTGAAG ACTGTATGC	GCAAGCGACTGAAA TG TAGGT
<i>FOXO1</i>	AGATCTACGAGTGGA TGGTGAAGAG	GGACAGATTGTGGC GAATTGAAT
<i>HIF1A</i>	ACATGATGGCTCCCTT TTCA	ACATAGTAGGGGCA CGGTCA
<i>NFKB2</i>	GAATTCAGCCCCTCCA TTG	CTGAAGCCTCGCTGT TTAGG
<i>GAPDH</i>	CCCTCAAGATTGTCAG CAATG	AGTTGTCATGGATGA CCTTGG
<i>ACTB</i>	CCCGCGAGTACAACC TTCT	CGTCATCCATGGCGA ACT

Постановку реакции ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR GreenI проводили с помощью набора компании «Евроген» (Россия). В качестве матрицы служила кДНК, полученная на стадии обратной транскрипции. Реакцию проводили на приборе АНК – 32 (Синтол,

Россия). Температурные режимы были выбраны следующие: первоначальный прогрев смеси в течении 3 минут при 95°C, затем 40 циклов, включающих стадию денатурации (95°C – 15 секунд), отжига праймеров (60°C – 15 секунд) и элонгации цепи (72°C – 30 секунд). По завершении ПЦР-РВ оценивали показатели пороговых циклов. Для исключения ложноположительных результатов параллельно с анализируемыми пробами ставили реакцию амплификации с отрицательно-контрольными образцами: а) на контаминацию компонентов наборов посторонней ДНК; б) на соблюдение условий чистоты при подготовке образцов для амплификации. Реакционная смесь первого отрицательного контроля (а) имела аналогичный опытным образцам состав, но в качестве исследуемого образца использовали контроль реакции обратной транскрипции. В реакционной смеси второго отрицательного контроля (б) вместо исследуемого образца добавляли воду. Расчет относительного уровня мРНК исследуемых генов проводили с помощью $2^{-\Delta\Delta C_t}$ метода [188].

2.3.7. Оценка степени развития апоптотических процессов

2.3.7.1. Определение степени фрагментации ДНК

2.3.7.1.1. Выделение тотальной ДНК

Для выделения тотальной ДНК применялся набор реагентов «К-Сорб» (Синтол, Россия).

В пластиковые 1,5 мл пробирки вносили 200 мкл анализируемого образца, 10 мкл протеиназы К и 200 мкл лизирующего буфера. Пробирки с содержимым перемешивали на вортексе и помещали в микротермостат на 15 мин при 65°C, периодически взбалтывая. Осаждали капли со стенок и крышки краткосрочным центрифугированием. Затем вносили 200 мкл осаждающего реагента и перемешивали, центрифугировали несколько секунд для сбрасывания капель со стенок. Смесь из пробирки в полном объеме переносили на колонку и центрифугировали при 8000g 1 мин. Для

промывания колонки последовательно приливали 400 мкл промывочного раствора 1, 400 и 200 мкл промывочного раствора 2. После внесения первых двух порций промывочных растворов центрифугировали колонки при 8000g 1 мин, после добавления последней порции – при 13000g 2 мин. По завершении каждого этапа центрифугирования отбрасывали содержимое коллектора.

Для получения очищенного препарата ДНК на колонку наносили прогретый до 70 °С элюирующий раствор и центрифугировали при 8000g в течение 1 мин.

2.3.7.1.2. Электрофорез ДНК

Оценку фрагментации ДНК проводили с помощью электрофореза образцов в агарозном геле с применением трис-ацетат-ЭДТА буфера (ТАЕ) [17]. Для приготовления 50-кратного ТАЕ буфера добавляли 50 мл дистиллированной воды к навеске, содержащей 24,22 г трис и 1,862 г ЭДТА. После растворения компонентов доводили рН до 7,6 уксусной кислотой (~8,96 мл или 9,4 г) и доливали воду до конечного объема 100 мл. Буфер для нанесения образцов включал 40% глицерина и 0,25% бромфенолового синего в 1-кратном ТАЕ буфере. Использовались маркеры молекулярной массы «MassRuler» фирмы «Fermentas», содержащие полинуклеотиды длиной от 1500 до 10000 нуклеотидных пар.

Для проведения электрофореза готовили 40 мл 1%-ного раствора агарозы в однократном ТАЕ буфере и нагревали до полного расплавления агарозы. После этого раствор охлаждали приблизительно до 60 °С, вносили 3 мкл 2% раствора бромистого этидия и аккуратно перемешивали, следя за тем, чтобы в геле не образовывались пузырьки воздуха. Теплую агарозу заливали в ячейку для геля, вставляли вертикально гребенку таким образом, чтобы зубцы не доставали до дна примерно 1,5 мм. Раствор оставляли при комнатной температуре на 20-30 мин до застывания геля, после чего

осторожно вынимали гребенку. Помещали гель в электрофоретическую камеру и заполняли её однократным ТАЕ-буфером в объеме, достаточном для покрытия пластинки агарозного геля.

Пробы исследуемой ДНК и маркерные образцы подготавливали, смешивая их с буфером для нанесения в пропорции 4:1. Полученные препараты в объеме 8 мкл аккуратно вносили в лунки геля. Электрофорез проводили при 86 В и 65 мА в течение 1 часа. Визуализацию результатов проводили с помощью трансиллюминатора в УФ-свете.

2.3.7.2. Оценка активности каспаз

Анализ активности каспаз-3 и -8 осуществляли с помощью набора реактивов Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric и Caspase 8 Assay Kit, Colorimetric («BioVision», США) согласно прилагаемым инструкциям. В основе колориметрического анализа активности каспаз лежит процесс гидролиза пептидного субстрата ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-нитроанилида (в случае каспазы 3) и ацетил-Ile-Glu-Thr-Asp-*p*-нитроанилида (в случае каспазы 8), приводящий к формированию *p*-нитроанилина, обладающего максимумом поглощения в области 405 нм (молярный коэффициент экстинкции = 10.5). Активность каспаз представляли в пикомолях продукта, образующегося за 1 мин, в расчете на 1 мг белка.

2.3.8. Определение содержания компонентов неферментативной антиоксидантной системы.

2.3.8.1. Определение концентрации восстановленного глутатиона

Метод основан на способности 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты (реактив Элмана) реагировать с сульфгидрильной группой GSH с образованием в эквимольных количествах тионитрофенильного аниона, имеющего максимум поглощения при 412 нм [4].

Ход определения:

1. В химическую пробирку вносили 0,5 мл исследуемого образца, 3,5 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 7,4 и тщательно перемешивали;
2. 2,0 мл разведенной в 8 раз пробы переливали в центрифужную пробирку и добавляли к ней 1,0 мл 20% трихлоруксусной кислоты (ТХУ), перемешивали и инкубировали 15 – 20 минут при 4 °С.
3. Центрифугировали пробирки со смесью 15 минут при 3000g и 0 ...+4 °С;
4. В чистые химические пробирки вносили по 0,5 мл фосфатного буфера и в каждую добавляли по 1,0 мл супернатанта;
5. В опытную пробирку приливали 0,05 мл реактива Элмана, а в контрольную пробирку – 0,05 мл метанола. Содержимое пробирок тщательно перемешивали;
6. Измеряли оптическую плотность опытной и контрольной проб против фосфатного буфера при 412 нм в 10 мм кювете.

Концентрация GSH рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{E_{\text{оп}} - E_{\text{к}}}{13,1 \times 10^3} \times 72,6 \times 10^3, \text{ ммоль/л} \quad (6)$$

где С – содержание GSH, ммоль/л; E_{оп} – оптическая плотность опытной пробы; E_к – оптическая плотность контрольной пробы; 13,1*10³ – коэффициент молярной экстинкции реактива Элмана при 412 нм; 72,6 – фактор разведения.

2.3.8.2. Определение содержания цитрата

Для оценки содержания цитрата использовали метод Нательсона. Принцип метода заключается в формировании поглощающего при 430 нм окрашенного комплекса тиомочевинны и пентабромацетона, который образуется из цитрата с помощью бромного реактива и перманганата калия, после чего экстрагируется петролейным эфиром [2]. Расчёт концентрации проводили с помощью калибровочной кривой.

К 0,5 мл анализируемого образца приливали 0,5 мл 17%-ной ТХУ, перемешивали и центрифугировали при 4000g 10 минут. 0,5 мл супернатанта отбирали в пробирку с притёртой пробкой, добавляли 0,25 мл 50%-ной H_2SO_4 , 0,1 мл 1М бромистого калия и 0,05 мл насыщенного раствора перманганата калия. Встряхивали и инкубировали в течение 20 минут при 4°C . Устраняли избыток перманганата калия внесением по каплям 3%-ного раствора H_2O_2 . Образовавшийся пентабромацетат экстрагировали путем добавления петролейного эфира в несколько этапов: в объеме 0,5 мл, снова 0,5 мл и затем 0,3 мл. После внесения каждой порции петролейного эфира пробирки встряхивали на шейкере в течение 5 минут. Для анализа концентрации пентабромацетата 1 мл эфирного экстракта переносили в пробирку с притёртой пробкой, содержащей 2,5 мл 2%-ного раствора тиомочевины в боратном буфере. Пробирку встряхивали в течение 5 минут, после разделения фаз водный (нижний) слой, имеющий светло-жёлтую окраску, осторожно отбирали пипеткой Пастера с оттянутым концом. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре Hitachi U-1900 при 430 нм. Фотометрирование проводили против контроля, представляющего собой 0,5 мл 10%-ного раствора ТХУ, обработанного тем же способом.

2.3.9. Оценка оксидативного статуса

2.3.9.1. Определение интенсивности биохемилюминесценции

Для анализа интенсивности процессов СО использовали метод хемилюминесценции, индуцированной железом и пероксидом водорода. Принцип метода заключается в каталитическом разложении H_2O_2 под действием ионов металла с переходной валентностью по реакции Фентона: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet + \text{Fe}^{3+}$. Генерируемые в ходе данного процесса АФК (R^\bullet , OH^\bullet , RO^\bullet , RO_2^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$) инициируют СО в тестируемой биологической пробе. При рекомбинации образующихся радикалов RO_2^\bullet формируется

неустойчивый тетроксид, который распадается с выделением квантов света. Измеряли активность свободнорадикальных процессов с использованием биохемилюминометра БХЛ-07М с программным обеспечением. Кинетическую кривую биохемилюминесценции регистрировали в течении 30 секунд (периода наибольшей информации об его динамике) и анализировали следующие показатели: светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность вспышки (I_{\max}), характеризующих интенсивность СО, и величину тангенса угла наклона касательной к кривой ($\text{tg}\alpha_2$), отражающую общую антиоксидантную активность [15]. На интенсивность исследуемого процесса влияет полный комплекс факторов, оказывающих как прооксидантное, так и антиоксидантное действие, что позволяет провести в тканях оценку степени активизации компенсаторных механизмов СО. Метод индуцированной хемилюминесценции, помимо прочего, является высокочувствительным по отношению к протекающим в организме патологическим процессам.

Для оценки интенсивности биохемилюминесценции применяли среду следующего состава: 0,4 мл 0,1М калий-фосфатный буфер (рН 7,5), 0,4 мл 0,01мМ FeSO₄, 0,2 мл 2%-ного раствора H₂O₂ (вносимого непосредственно перед измерением). Анализируемую пробу добавляли в объеме 0,1 мл перед внесением 2%-ного раствора H₂O₂.

2.3.9.2. Определение содержания диеновых конъюгатов

Для оценки содержания диеновых конъюгатов (ДК) использовали спектрофотометрический метод. В основе метода лежит процесс, при котором в ходе ПОЛ на этапе генерации свободных радикалов в молекулах полиненасыщенных жирных кислот формируется система сопряженных двойных связей, обуславливающая возникновение максимума в спектре поглощения при 233 нм [44].

К 0,125 мл исследуемой пробы добавляли 0,125 мл физиологического раствора, перемешивали, затем приливали по 1,5 мл гептана и изопропанола.

Полученную смесь переносили в пробирки с плотно закрывающимися пробками и центрифугировали 10 мин при 3000g. Супернатант отбирали в чистые сухие пробирки и вносили 1/10 объема дистиллированной воды. После встряхивания и расслаивания фаз в новую пробирку переносили верхний гептановый слой, к которому добавляли этиловый спирт по 0,5 мл до конечного соотношения 1:5. В качестве контроля использовали 96% этанол.

Содержание ДК в гомогенате головного мозга рассчитывали по формуле:

$$[\text{ДК}] = \frac{V_{\text{общ}} \times D \times 10^6}{L \times E \times m \times V_{\text{внес}}}, \text{ мкмоль/г} \quad (7)$$

где [ДК] – концентрация диеновых конъюгатов; $V_{\text{общ}}$ – объём полученного образца, мл; D – величина оптической плотности, ед.; L – длина оптического пути, см; E – коэффициент молярной экстинкции, равный $2,2 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$; $V_{\text{внес}}$ – объём вносимой пробы, мл.

В сыворотке крови содержание ДК определяли по формуле:

$$C = \frac{D \times 10^6}{L \times V_{\text{внес}} \times 2,2 \times 10^5}, \text{ мкмоль/мл} \quad (8)$$

где C – концентрация ДК, мкмоль/мл; D – величина оптической плотности, ед.; L – длина оптического пути, см; $2,2 \times 10^5$ – коэффициент молярной экстинкции, $\text{М}^{-1} \text{ см}^{-1}$; $V_{\text{внес}}$ – объём вносимой пробы, мл.

2.3.9.3. Оценка окислительной модификации белков

В основе оценки степени окислительной модификации белков (ОМБ) лежит способность взаимодействия карбонильных остатков аминокислот с 2,4-динитрофенил-гидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов [38]. Для исследования спонтанной ОМБ к 0,1 мл сыворотки крови (0,3 мл гомогената) добавляли 100 мМ фосфатный буфер, рН 7,4, до конечного объема пробы 1 мл. После перемешивания пробирки помещали в термостат на 15 минут при 37°C. Затем в холостую пробу добавляли 4 мл 2,5 М соляной кислоты, а в опытную пробу – 4 мл 10 мМ 2,4-

ДНФГ, растворенного в 2,5 М HCl. Пробирки с опытной и холостой пробой инкубировали при комнатной температуре 1 час в темноте, встряхивая каждые 15 минут. После инкубации в каждую пробирку вносили по 5 мл холодной 20% ТХУ для осаждения белка и выдерживали в холодильнике 15 минут. Затем пробирки центрифугировали при 3000g в течение 15 минут для формирования белкового осадка, супернатант удаляли. Осадок белка промывали 4 мл 10% ТХУ и вновь осаждали. Для экстракции липидов и удаления 2,4-ДНФГ, не вступившего в реакцию с карбонильными группами аминокислот, осадок механически разрушали, промывали трижды 4 мл смеси этанол:этилацетат (1:1), после чего осадок белка растворяли в 2 мл 8 М мочевины и инкубировали при 37°C 1 час периодически перемешивая. Оптическую плотность опытной пробы измеряли при 370 нм относительно холостой, обработанной 2,5 М соляной кислотой. При расчете содержания карбонильных аминокислотных групп в белках (нМ) использовали коэффициент молярной экстинкции $\xi = 22,000 \text{ см}^{-1} \times \text{M}^{-1}$. С целью нивелирования погрешности, обусловленной потерей 10- 15% белка на всех этапах промывания, полученные значения переводили в нМ карбонильных групп на мг белка. Концентрацию белка измеряли с помощью биуретового метода.

2.3.10. Унифицированный метод определения содержания общего белка по биуретовой реакции

В основе метода лежит способность белков реагировать в щелочной среде с сульфатом меди, при этом образуется комплексное соединение, имеющее фиолетовую окраску.

Используемые реактивы:

1. Физиологический раствор.
2. Биуретовый реактив. Приготовление: в литровую мерную колбу наливают 100-150 мл дистиллированной воды, вносят 8 г NaOH, 45 г

сегнетовой соли (калий-натрий виннокислый четырёхводный), 15 г сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) и 5 г йодида калия (KI). Каждое соединение добавляется после полного растворения предыдущего строго в указанной очередности. Раствор оставляют при комнатной температуре на ночь, затем доводят водой в колбе до метки. Хранят в темной посуде при 4 °С.

3. 0,2 М раствор гидроксида натрия.
4. 30 мМ раствор йодида калия в 0,2 М гидроксида натрия.
5. Рабочий раствор биуретового реактива: смешать биуретовый реактив и раствор KI в пропорции 1:4.
6. Основной калибратор: раствор сывороточного альбумина в физиологическом растворе в концентрации 100 г/л.

Ход определения. В пробирку наливали 2 мл рабочего биуретового реактива, вносили 0,04 мл анализируемой пробы, перемешивали. Оптическую плотность измеряли через 30 мин относительно контроля при 540 нм. В контрольную пробирку вместо исследуемого образца вносили физиологический раствор.

Расчёт концентрации белка осуществляли по калибровочному графику, который строили путем приготовления рабочих растворов альбумина различной концентрации (табл. 2). С каждым раствором альбумина осуществляли биуретовую реакцию, как описано выше. По полученным данным строили график зависимости оптической плотности пробы от концентрации белка. Калибровочный график линеен до величины поглощения 0,5. При более высоком показателе поглощения образец разводят физиологическим раствором в соотношении 1:1 [32].

Приготовление рабочих калибровочных растворов белка

№ раствора	Основной калибровочный раствор альбумина, мл	Изотонический раствор NaCl, мл	Концентрация белка, г/л
1	0,2	0,8	20
2	0,4	0,6	40
3	0,6	0,4	60
4	0,8	0,2	80
5	1,0	-	100

2.4. Статистическая обработка экспериментальных данных

Опыты проводили в 10-32-кратных биологических повторностях. Аналитические повторы были проведены как минимум дважды для каждого образца. 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:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}; s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1}}; s_{\bar{X}} = \frac{s}{\sqrt{n}}, \quad (9)$$

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 исследований обрабатывали с применением t-критерия Стьюдента с расчетом среднего значения,

стандартного отклонения. Достоверно различающимися считали показатели, для которых $p < 0,05$ [16, 24].

ГЛАВА 3. АНАЛИЗ ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕЛАКСЕНА И ЭПИФАМИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ НЕЙРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ КРЫС С ИШЕМИЕЙ/РЕПЕРФУЗИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

3.1. Концентрация мелатонинсульфата в моче экспериментальных животных в условиях развития ишемии/реперфузии и введения мелаксена и эпифамина

Для оценки корригирующего эффекта мелаксена и эпифамина на уровень мелатонина был проведен анализ концентрации в моче крыс экспериментальных групп его основного метаболита – мелатонинсульфата. Как показали результаты исследования, развитие ИРГМ у животных сопровождалось снижением уровня данного соединения в 1,6 раза относительно контрольных показателей. Наблюдаемые изменения могли быть связаны с функционированием мелатонина в качестве сквенджера свободных радикалов и последующего его превращения в такие соединения, как N[1]-ацетил-N[2]-формил-5-метоксикинумарин, 3-гидроксимелатонин и др. Введение мелатонин-корригирующих препаратов на фоне патологии, в свою очередь, способствовало восстановлению содержания мелатонина, о чем свидетельствовали изменения концентрации мелатонинсульфата в моче животных. Так, при использовании эпифамина в дозах 1,25 и 2,5 мг/кг, содержание данного метаболита возрастало в 1,3 и 1,4 раза соответственно, относительно показателей второй экспериментальной группы, и достигало 17,2 и 18,4 мг/мл. Введение мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг при этом приводило к увеличению концентрации мелатонинсульфата до 18,6 и 19,8 нг/мл, что превышало показатели животных с патологией в 1,4 и 1,5 раза (рис. 2). Таким образом, под воздействием тестируемых препаратов наблюдалось позитивное регулирующее воздействие на метаболизм мелатонина.

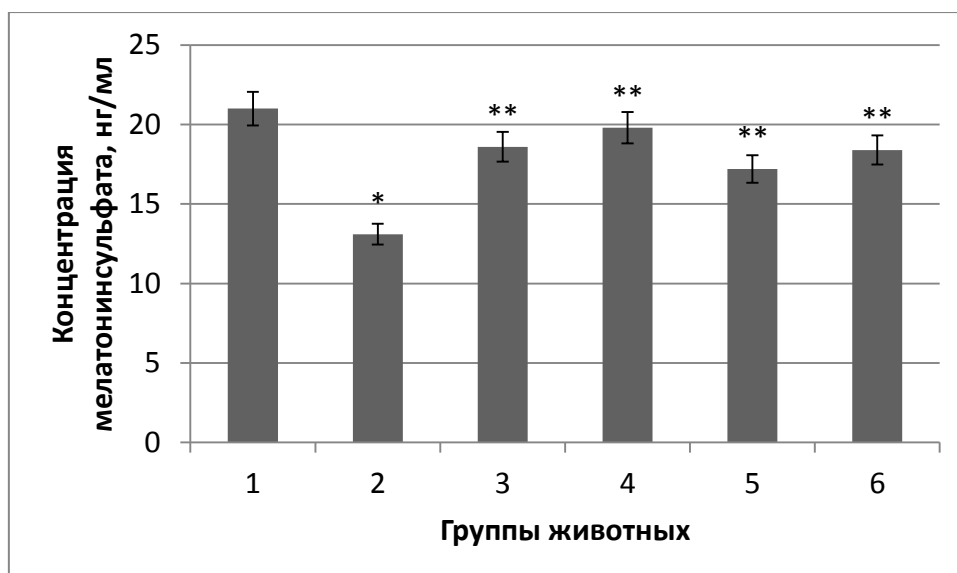


Рис. 2. Концентрация мелатонинсульфата в моче ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

3.2. Уровень лактата в мозге крыс в условиях развития ишемии/реперфузии и введения мелаксена и эпифамина

Из литературных данных хорошо известно, что нарушение метаболизма в головном мозге, вызванное ишемией и реперфузией, способствует торможению аэробного катаболизма глюкозы и компенсации энергодефицита за счет активизации анаэробного гликолиза [11]. Происходящее при этом накопление лактата приводит к ацидозу в ишемизированной ткани, который обуславливает угнетение в клетке обмена веществ и процессов ионного транспорта, а также оказывает цитотоксический эффект через нарушение функциональных свойств нейрональных мембран, что усугубляется возрастанием интенсивности СО [51].

Проведенные исследования показали, что использование мелатонин-корректирующих препаратов способствовало снижению в мозге концентрации лактата, возросшей на фоне развития ИРГМ, при этом выраженного дозозависимого эффекта не наблюдалось. Введение мелаксена и эпифамина приводило к уменьшению содержания молочной кислоты в 3,2 и 3,0 раза относительно показателей животных второй группы (рис. 3).

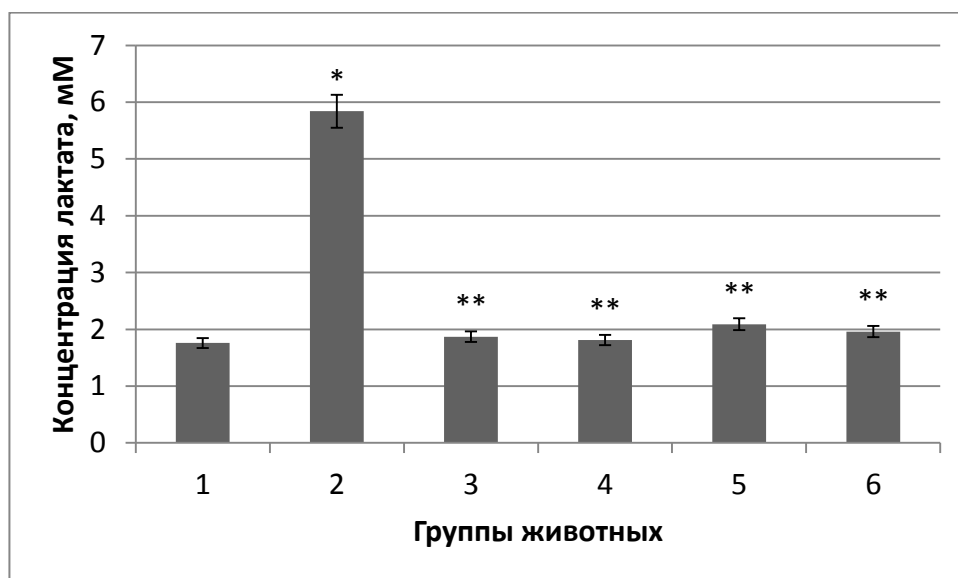


Рис. 3. Концентрация лактата в мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

По-видимому, наблюдаемые изменения были обусловлены воздействием мелатонина, уровень которого в организме животных повышался в условиях введения тестируемых препаратов, о чем свидетельствовали изменения концентрации мелатонинсульфата в моче крыс. Нейропротекторная активность мелатонина была продемонстрирована в условиях ишемии головного мозга на различных видах животных [218]. Гормон способен предупреждать гибель нейронов, индуцированную возбуждающими аминокислотами, ослаблять повреждение нейронов CA1 гиппокампа, вызванное транзиторной ишемией переднего мозга или

высокими дозами глюкокортикоидов [212]. Введение мелатонина после моделирования инсульта у животных способствовало уменьшению объема инфаркта, что наблюдалось как в сером, так и в белом веществе. Гормон также снижал степень воспалительного ответа, формирование отека головного мозга и проницаемость гематоэнцефалического барьера [215].

3.3. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на показатели окислительного стресса в тканях крыс при развитии ишемии/реперфузии головного мозга

В настоящее время известно, что окислительный стресс является одним из ключевых звеньев патогенеза ишемии/реперфузии и связан с различными источниками АФК. Определенную роль в генерации свободных радикалов играют неферментативные источники АФК, такие как гемоглобин и миоглобин. Однако в большинстве работ основная роль по производству реактивных молекул в пост-ишемических тканях отводится нескольким ферментам, в частности ксантинооксидазе, НАДФН-оксидазе, комплексам митохондриальной транспортной цепи электронов и синтазе оксида азота, переключающейся на генерацию супероксидного анион-радикала [144]. В качестве важного медиатора повреждения нервных клеток в ишемизированной ткани головного мозга и гематоэнцефалического барьера свободные радикалы кислорода могут усугубить возникновение и развитие отека мозга, послеишемического кровоизлияния и некроза. Свободные радикалы атакуют мембранные структуры и ДНК, разрушая мембраны эндотелиальных клеток и приводя к нарушениям в транспорте ионов, производстве энергии и функционировании клеток. Микроциркуляторная часть сосудистого русла гематоэнцефалического барьера уязвима к окислительному повреждению из-за относительно низкой антиоксидантной способности, высокого содержания полиненасыщенных жирных кислот в мембранах и доступности редокс-активного железа [68].

В ходе работы было показано возрастание показателей интенсивности СО у крыс с ИРГМ, что согласуется с полученными ранее данными [8]. Так, у животных второй экспериментальной группы увеличивались показатели биохемилюминесценции, в частности S , I_{\max} и $\text{tg}\alpha 2$ повышались в мозге животных в 2,3, 2,1 и 2,5 раза относительно контрольных значений. В сыворотке крови крыс с патологией S , I_{\max} и $\text{tg}\alpha 2$ увеличивались в 1,8, 2,2 и 2,4 раза соответственно (табл. 4). Наряду с этим, развитие ИРГМ было сопряжено с накоплением первичных продуктов ПОЛ – ДК, концентрация которых возрастала в мозге в 1,8 раза, а в сыворотке крови животных – в 1,7 раза (рис. 4). Интенсификация СО приводила также, судя по всему, к накоплению белков, подвергшихся окислительной модификации. Содержание карбонильных аминокислотных остатков у животных с индуцированной патологией увеличивалось в 2,0 раза в мозге и 2,2 раза в сыворотке крови (рис. 5).

АФК, генерируемые в избытке в ходе патогенеза ИРГМ, способны повреждать железо-серный кластер активного центра АГ, рассматриваемой в настоящее время в качестве маркера окислительного стресса. Действительно, в ходе работы было выявлено падение активности данного фермента в образцах животных второй экспериментальной группы более чем в 2 раза (рис. 6). Изменения удельной активности фермента имели схожую динамику. На фоне угнетения функционирования АГ происходило накопление продукта прямой аконитазной реакции – цитрата, который способен играть роль антиоксиданта, хелатируя с помощью карбоксильных групп ионы металлов переменной валентности, в том числе Fe^{2+} из разрушенного активного центра АГ (рис. 7).

Введение мелаксена и эпифамина крысам с ИРГМ оказывало, по-видимому, смягчающий эффект на состояние оксидативного стресса, что выражалось в изменении соответствующих показателей и было обусловлено коррекцией уровня мелатонина в организме животных, о чем свидетельствовало в увеличение в моче крыс концентрации

мелатонинсульфата. Наиболее выраженное воздействие при этом оказывал мелаксен в дозе 10 мг/кг веса тела животного. Так, администрация крыс с патологией указанной дозировкой препарата приводила к уменьшению показателей биохемилюминесценции: S, I_{max} и tgα₂ понижались в 2,2, 1,7 и 2,4 раза в мозге животных, и в 1,7, 2,0 и 2,3 раза в сыворотке крови соответственно (см. табл. 4). Наблюдалось в данных условиях и падение концентрации ДК в мозге и сыворотке крыс на 42 и 37 % (см. рис. 4), снижение уровня карбонильных остатков аминокислот в белках составило 17 и 39 % соответственно, относительно значений животных с патологией (см. рис. 5). Позитивное воздействие тестируемый препарат оказывали и на функционирование АГ, активность которой восстанавливалась в мозге и сыворотке крови животных на 134 и 104 %, относительно показателей второй экспериментальной группы, причем схожие изменения наблюдались и для удельной активности фермента (см. рис. 6). Содержание цитрата при этом уменьшалось в мозге и сыворотке крови крыс на 133 и 149 % (см. рис. 7). Значимых изменений показателей интенсивности СО у крыс 7 и 8 экспериментальной группы относительно контрольных животных выявлено не было.

Табл. 4. Показатели биохемилюминесценции в мозге и сыворотке крови ложнооперированных крыс, животных с ишемией/реперфузией головного мозга, а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозах 5 и 10 мг/кг, и эпифамина в дозах 1,25 и 2,5 мг/кг. Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

Группа животных	Мозг			Сыворотка крови		
	S, мВ*с	I _{max} , мВ	tgα ₂	S, мВ*с	I _{max} , мВ	tgα ₂
1	11,66±0,46	1,72±0,06	1,93±0,07	33,10±1,35	6,12±0,21	1,09±0,04
2	26,85±0,71*	3,68±0,12*	4,75±0,14*	58,99±2,80*	13,61±0,45*	2,63±0,09*
3	12,11±0,47 **	2,3±0,09 **	3,72±0,11 **	34,61±1,09 **	9,06±0,35 **	2,20±0,10 **
4	12,02±0,38 **	2,16±0,08 **	2,01±0,10 **	33,92±0,99 **	6,71±0,27 **	1,16±0,04 **
5	16,61±0,51 **	2,94±0,12 **	4,12±0,15 **	41,23±1,56 **	11,09±0,39 **	2,35±0,08 **
6	15,35±0,56 **	2,87±0,12 **	4,04±0,16 **	39,06±1,27 **	10,01±0,40 **	2,29±0,09 **

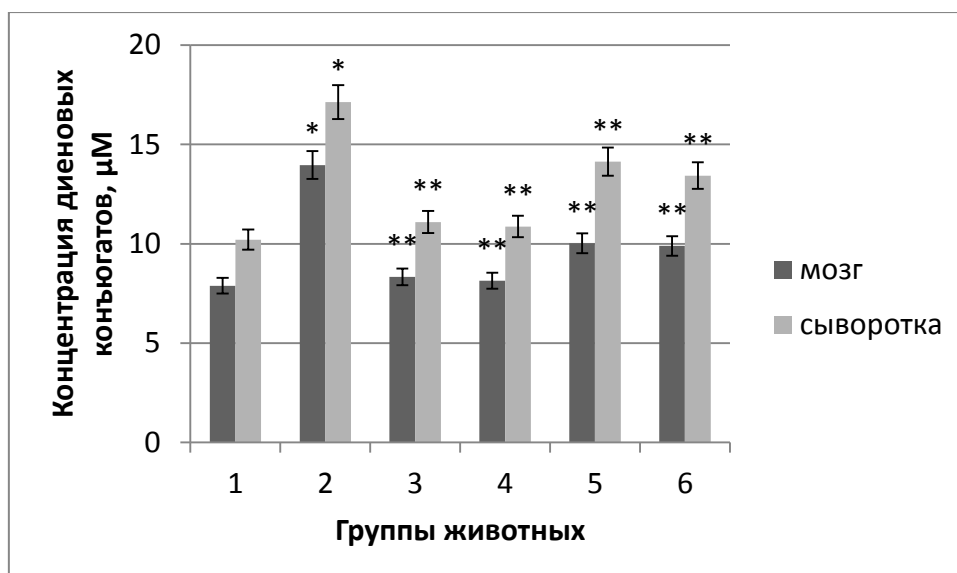


Рис. 4. Концентрация диеновых конъюгатов в мозге и сыворотке крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

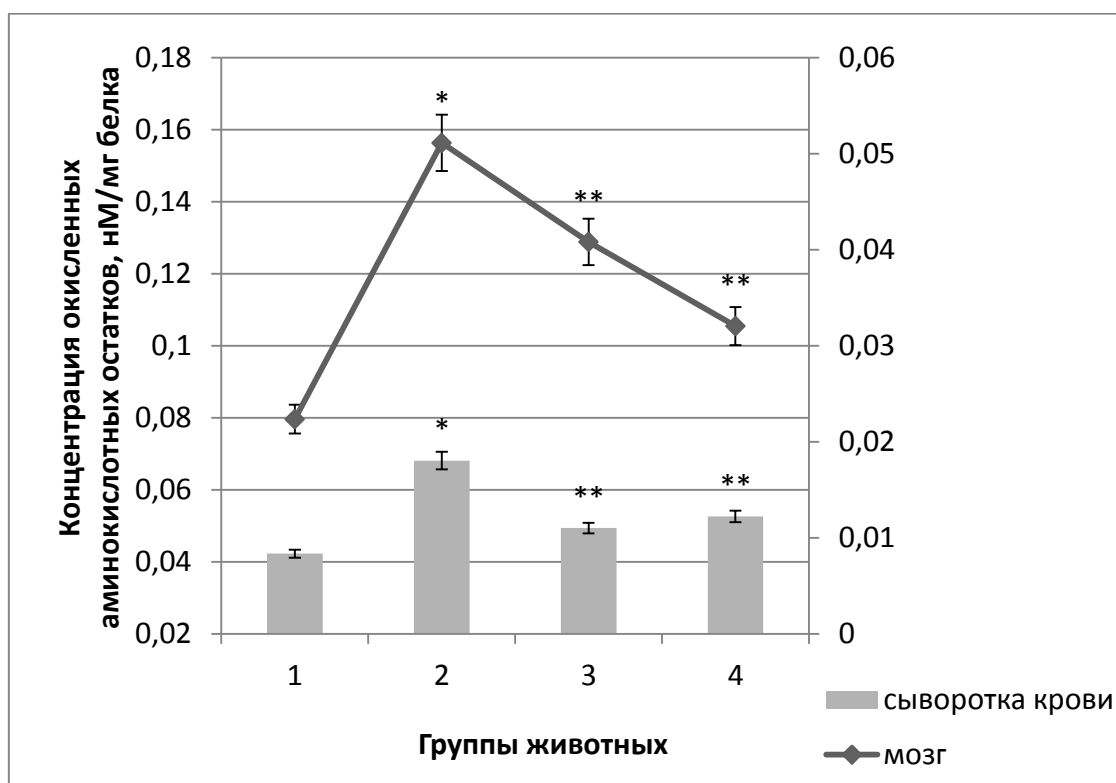
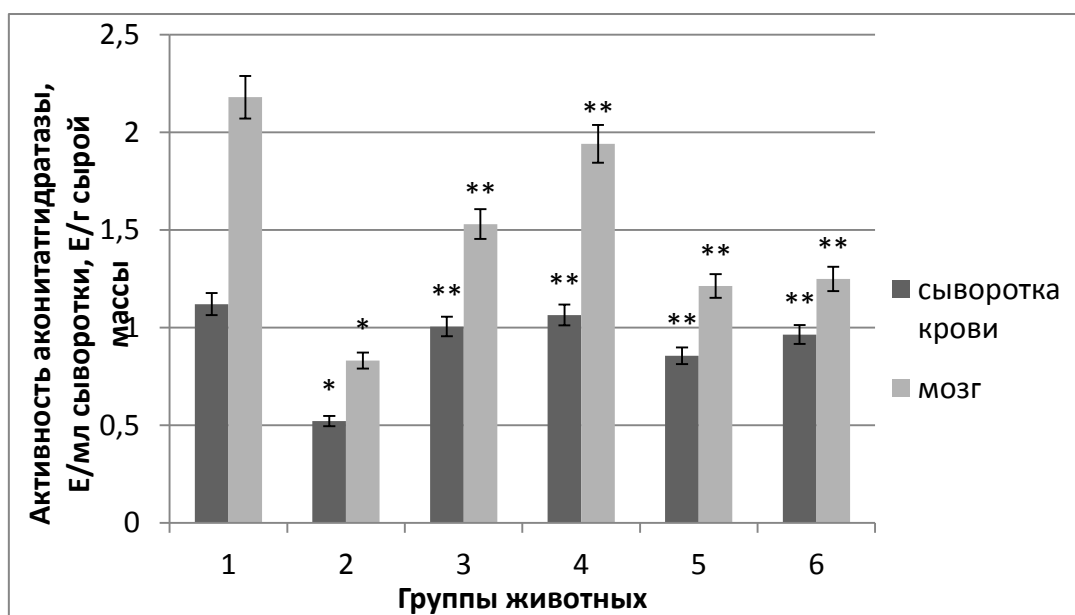
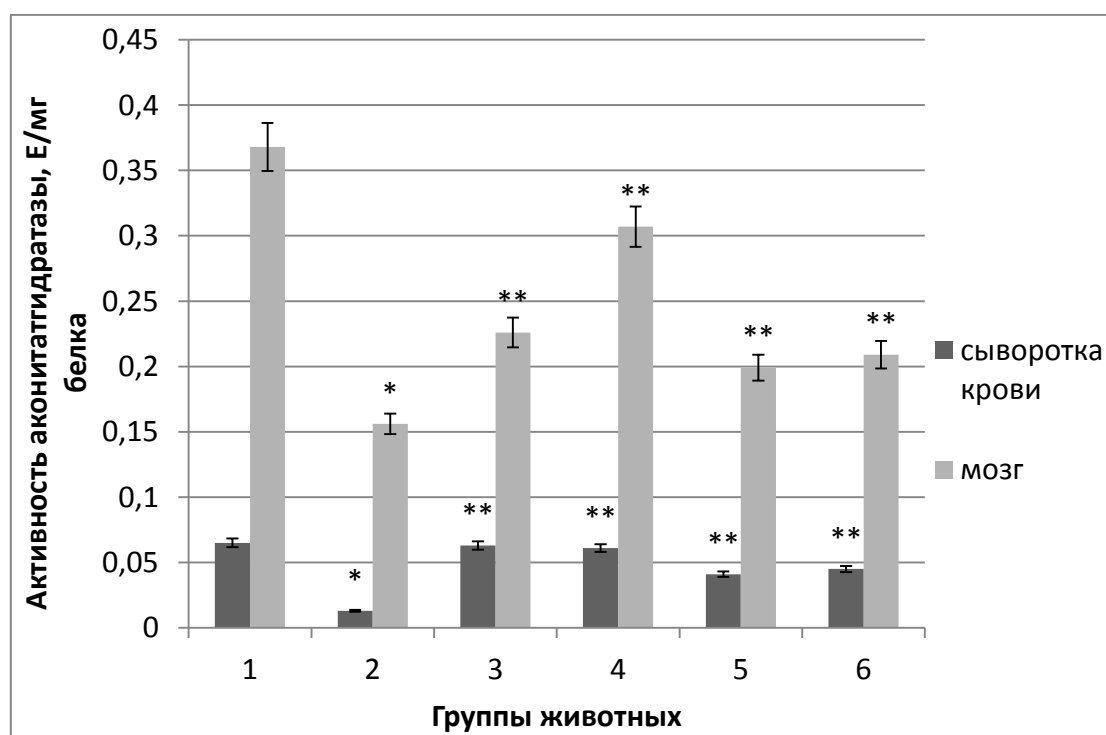


Рис. 5. Уровень окислительной модификации белков в мозге и сыворотке крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 10 мг/кг (3), и эпифамина в дозе 2,5 мг/кг (4). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.



А



Б

Рис. 6. А. Активность аконитатгидратазы, выраженная в Е/мл сыворотки крови и Е/г сырой ткани мозга ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$. Б. Удельная активность аконитатгидратазы в сыворотке крови и мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

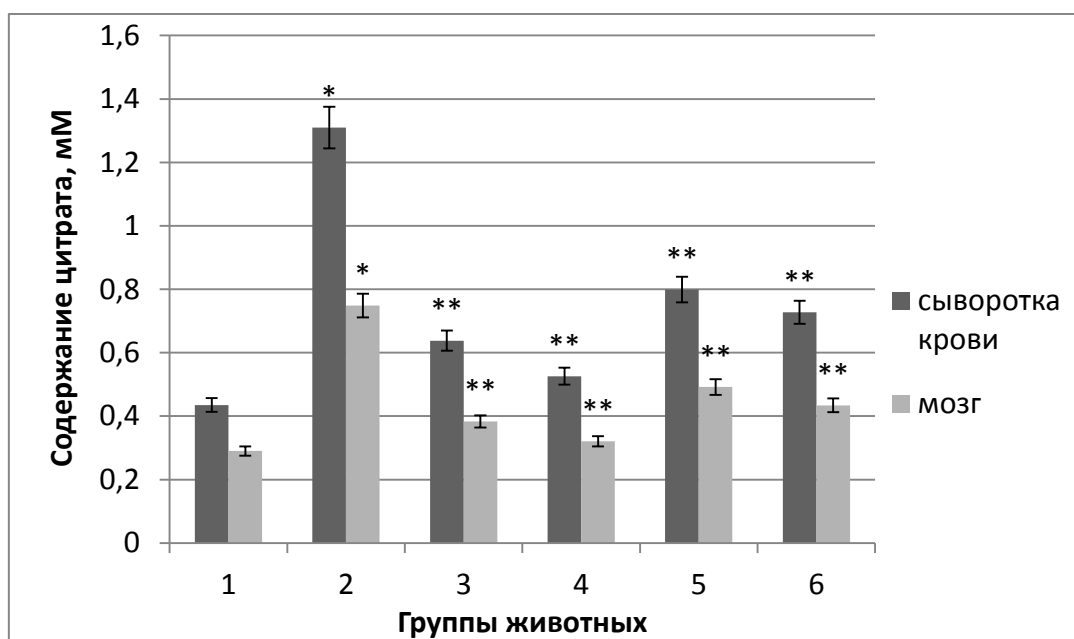


Рис. 7. Содержание цитрата в сыворотке крови и мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы

достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

К настоящему времени накоплен достаточно большой массив данных, позволяющих относить мелатонин к биологически активным соединениям, обладающим мощным антиоксидантным потенциалом. Показано, что эффективность мелатонина значительно превосходит эффективность его естественных аналогов [216]. Он способен непосредственно нейтрализовать OH^\bullet , H_2O_2 , NO и другие радикалы [136], при этом продукты окисления мелатонина восстановлению не подвергаются и выводятся из организма [230]. Данный гормон способен вызывать торможение процессов СО посредством нескольких механизмов, включая прямое взаимодействие с АФК, а также регуляцию уровня эндогенных антиоксидантов в клетке [63]. Необходимо отметить, что опосредованное антиоксидантное действие мелатонин может оказывать через свои рецепторы, MT1 и MT2 . Он имеет сайты связывания в ядре, свободно пересекает клеточные мембраны. В отличие от классических антиоксидантов, мелатонин является суицидальным терминальным антиоксидантом: он не способствует протеканию окислительных реакций, а его метаболиты также могут действовать как антиоксиданты - «скавенджеры», не приобретая окислительных свойств [124]. Известно также, что мелатонин улучшает митохондриальное дыхание и усиливает синтез АТФ в физиологических и патологических условиях. Следовательно, антиоксидантные и свободнорадикальные способности гормона могут обеспечивать защиту белков ЭТЦ и митохондриальную ДНК от окислительного повреждения, вызванного свободными радикалами. Воздействие гормона на уровне митохондриальной ДНК также увеличивает экспрессию комплекса IV и активность комплекса I и комплекса IV ЭТЦ, что способствует протеканию процессов четырёхэлектронного восстановления кислорода [213].

В настоящее время в качестве важного звена в патогенезе ишемии головного мозга рассматриваются повреждения нейронов, опосредованные

нейротоксичностью глутамата, обусловленной действием NO. Образование NO происходит из L-аргинина под действием фермента NOS. На данный момент известно несколько изоформ NOS: iNOS и конститутивная, постоянно присутствующая в ткани (cNOS). Выделяют также три формы NOS в зависимости от локализации: нейрональную (NOS-I, nNos), индуцибельную (NOS-II, iNOS) и эндотелиальную (NOS-III, eNOS). NOS-I содержат около 2% кортикальных интернейронов, а также ГАМК-ергические корзинчатые клетки мозжечка, полосатое тело и глутаматергические гранулярные клетки [40]. Как правило, NOS-I-содержащие кортикальные нейроны, включают соматостатин, ГАМК и нейропептид Y [10].

В реализации патофизиологических механизмов дисфункции мозгового кровотока принимают участие не только NOS-I, но также NOS-II и NOS-III. Литературные данные касательно изменений концентрации NO в церебральных структурах в условиях ишемии весьма противоречивы. Имеются сведения, свидетельствующие об увеличении, понижении и фазности изменений количества генерируемого NO в ишемизированном мозге [134]. Высвобождение NO в условиях острой ишемии мозга может оказывать как отрицательный, так и положительный эффект на исход гипоксического воздействия. Увеличение активности eNOS оказывает нейропротекторный эффект, что может быть связано с церебральным вазодилататорным влиянием NO, торможением адгезии эндотелиальных лейкоцитов и агрегации тромбоцитов [240]. Применение доноров NO и ингибиторов NOS на моделях локальной церебральной ишемии и при развитии инфаркта мозга также приводит к неоднозначным и весьма противоречивым результатам [161, 235, 236, 253, 266]. По-видимому, NO обладает способностью оказывать нейропротекторное действие на начальном этапе развития ишемии, но, вместе с тем, проявлять во время реперфузии нейротоксический эффект [29, 58, 106].

Негативное влияние обусловлено повышенным образованием свободнорадикальных продуктов: в комбинации с супероксидными

радикалами NO образует токсический пероксинитрит, повреждающий мембраны клеток, окисляющий молекулы липидов, белков, ДНК и других структур, и способствующий нейродегенеративным повреждениям [237].

В свою очередь, наличие противовоспалительных и нейропротекторных свойств у мелатонина может быть обусловлено его способностью блокировать ряд факторов транскрипции, приводя к снижению секреции провоспалительных цитокинов и ингибированию циклооксигеназы 2 и iNOS, активация которых характерна для хронических воспалительных процессов [209].

3.4. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на уровень транскриптов генов факторов HIF-1 и NF-κB у крыс в условиях развития ишемии/реперфузии головного мозга

Как известно, ишемия опосредует формирование вторичного повреждения, обусловленного эксайтотоксичностью, перегрузкой нейронов кальцием, апоптозом, аутофагией и нейровоспалением. Контролирует иницирование и развитие основной воспалительной реакции ядерный транскрипционный фактор NF-κB, представленный в цитоплазме в связанной форме с белком-ингибитором альфа (IκBα). В условиях ишемии NF-κB высвобождается и транслоцируется в ядро, где способствует активизации экспрессии провоспалительных цитокинов [308]. В условиях развития ИРГМ также вызывает интерес анализ функционирования транскрипционного фактора HIF-1, играющего важную роль в регуляции гомеостаза кислорода и адаптации клетки к условиям ишемии [275].

Как показали проведенные исследования, развитие ИРГМ сопровождалось возрастанием уровней мРНК факторов NF-κB и HIF-1 в мозге животных в 1,7 и 3,7 раза относительно контрольных показателей. Вместе с тем, введение крысам с патологией мелаксена в дозе 10 мг/кг и

эпифамина в дозе 2,5 мг/кг способствовало уменьшению уровня транскриптов HIF-1 на 15 и 10 % соответственно, а NF-kB – в 1,2 раза (рис. 8).

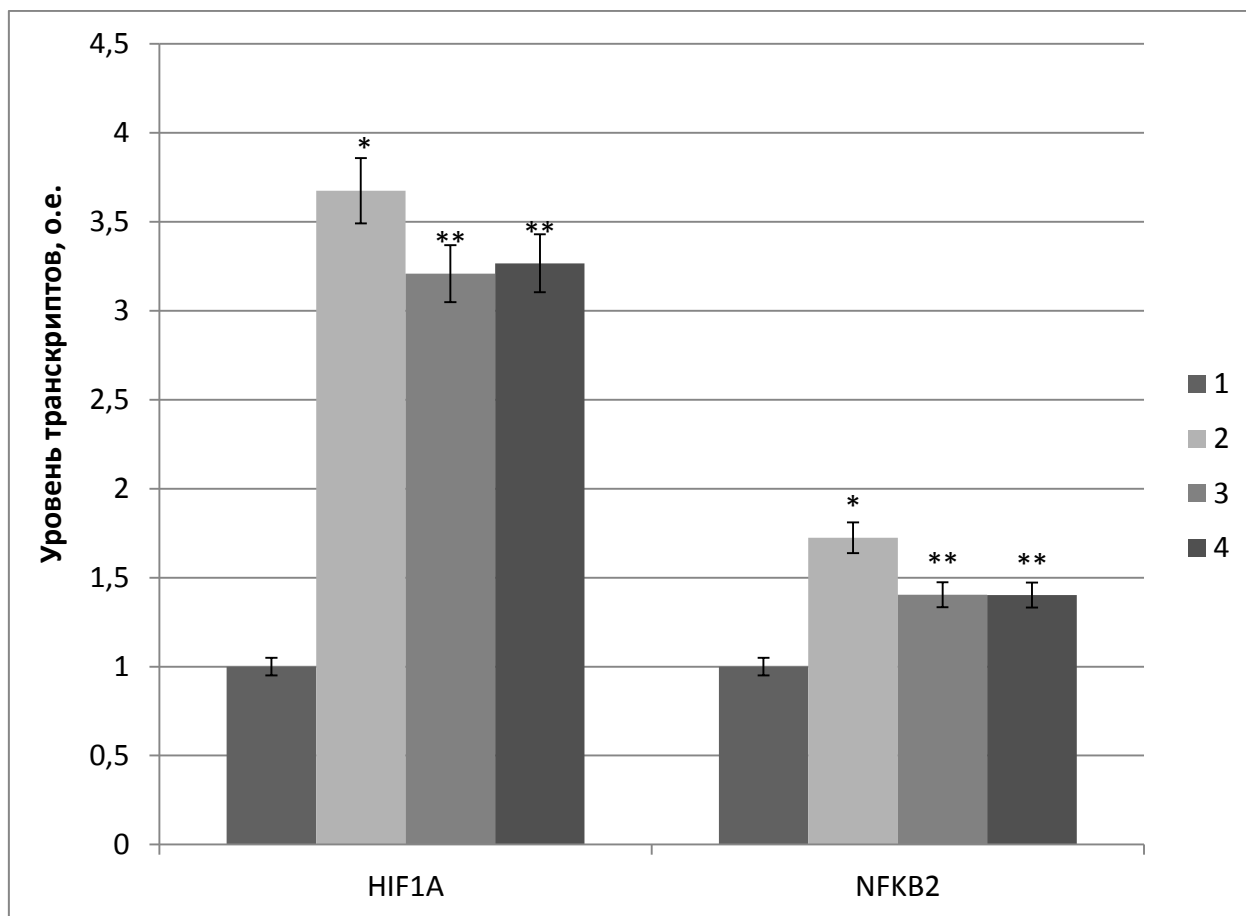


Рис. 8. Уровень транскриптов генов HIF-1 (*HIF1A*) и NF-kB (*NFKB2*) в мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 10 мг/кг (3), и эпифамина в дозе 2,5 мг/кг (4). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

Существенную роль в ишемическом и реперфузионном повреждении играет процесс воспаления. Известно, что после ишемии происходит фосфорилирование и активация ИКК β – регулятора NF-kB. ИКК β , в свою очередь, фосфорилирует ИкBa и способствует его протеолизу, результатом чего является высвобождение и транслокация в ядро фактора NF-kB, где он усиливает экспрессию провоспалительных цитокинов [308]. Имеются данные о взаимосвязи путей, контролируемых факторами NF-kB и HIF.

Субъединицы NF-κB p50 и p65 могут непосредственно взаимодействовать с консенсусным сайтом NF-κB на промоторе *HIF-1α* и способствуют возрастанию базальных уровней мРНК и белка HIF-1 в некоторых моделях патологий [111]. Помимо этого, активация экспрессии гена *HIF-1α* на уровне трансляции может иметь место в условиях гипоксических состояний NF-κB-независимым путем [275]. Действительно, как показали наши исследования, у животных с ИРГМ увеличивалось количество мРНК HIF-1α. HIF-1 функционирует как главный регулятор гомеостаза кислорода, контролируя как доставку, так и использование O₂. HIF-1 представляет собой гетеродимер, который состоит из O₂-регулируемой субъединицы HIF-1α и конститутивно экспрессируемой субъединицы HIF-1β. Альфа-субъединицы деградируют во время нормоксии, главным образом, через протеасомо-зависимый путь после гидроксирования двух остатков пролина пролил-гидроксилазами. Во время гипоксии эти ферменты подвергаются ингибированию, субъединица HIF-1α накапливается, димеризуется с HIF-1β и активирует экспрессию генов-мишеней HIF. Активация транскрипции происходит путем связывания данного фактора с основной ДНК-последовательностью 5'-RCGTG-3 '(R = A или G), которая встроена в элемент ответа на гипоксию (hypoxia response element, HRE) [275]. Среди мишеней HIF представлены гены, участвующие в ангиогенезе и восстановлении тканей, такие как фактор роста эндотелия сосудов, эритропоэтин, пропилгидроксилазы [160]. HIF-1 также активирует транскрипцию генов, кодирующих ферменты, транспортеры и митохондриальные белки, которые уменьшают использование O₂, функционируя в качестве основного индуктора переключения клеток с окислительного метаболизма на гликолитический метаболизм. Активность HIF-1 регулируется посредством изменения уровней мРНК и белка HIF-1α в мозге, сердце, почках, легких и скелетных мышцах [275]. Имеются данные, что одним из адаптивных ответов на сублетальный стресс является аутофагия, регуляция которой также осуществляется фактором транскрипции HIF. Процесс митохондриальной аутофагии индуцируется гипоксией и

требует HIF-зависимой экспрессии аутофагических генов, что указывает на важную роль данного фактора в метаболической адаптации гипоксических или ишемических тканей в условиях дефицита кислорода [116]. Как показали исследования, снижению уровней экспрессии NF- κ B и HIF-1 α у крыс с ИРГМ способствовало введение мелаксена и эпифамина, обуславливающее коррекцию уровня мелатонина. По-видимому, достаточно мощная антиокислительная активность данного гормона приводила к уменьшению выраженности оксидативного стресса и, как следствие, торможению индукции фактора NF- κ B. Имеются также сведения, касающиеся наличия у мелатонина противовоспалительных свойств, в том числе за счет блокирования NF- κ B-пути. Так, показано, что введение гормона значительно предотвращало деградацию I κ B α и блокировало транслокацию p65 в ядро [208]. Выявлена способность мелатонина ингибировать экспрессию циклооксигеназы-2, которая опосредуется стимуляцией транслокации p50 NF- κ B из ядра в цитозоль, а также ингибированием связывания p50 NF- κ B с промотором гена этого фермента [207]. Блокирование пути NF- κ B мелатонином было продемонстрировано в мышечных макрофагах, эндотелиальных клетках крыс и клетках нейробластомы человека. Ингибирование гормоном ядерной транслокации NF- κ B тормозит также экспрессию индуцируемой изоформы синтазы оксида азота и синтез NO, обеспечивая цитозащитный эффект [130]. В целом же мелатонин действует как иммунный буфер, стимулируя иммунную систему в иммуносупрессивных условиях и оказывая противовоспалительное действие при остром воспалении [214]. В литературе имеются сведения и о воздействии данного гормона на активность HIF-1 α . Так, в условиях гипоксии мелатонин способен снижать активность индуцируемого фактора HIF-1 α [247]. В клетках рака печени показана антиангиогенная активность гормона, опосредованная ингибированием ядерной транслокации HIF-1 α , необходимой для экспрессии фактора роста эндотелия сосудов. Более того,

результаты, представленные в других типах опухолей, также указывают на способность мелатонина модулировать активность NIF-1 α [164].

ГЛАВА 4. ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОТЕКАНИЯ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ МЕЛАКСЕНА НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

3.1. Степень фрагментации ДНК в мозге крыс в условиях развития ишемии/реперфузии и введения мелаксена

Из литературы известно, что характерные для ИРГМ цитотоксические стимулы, такие как окислительный стресс, способны активировать апоптоз. Показано, что апоптоз индуцируется ишемией/реперфузией, хотя число клеток, умирающих по этому пути, несколько ниже, чем посредством некроза [165]. Помимо этого, наряду с гибелью клеток по типу апоптоза и некроза, в условиях ишемии/реперфузии наблюдается также атипичная форма гибели, совмещающая признаки обоих процессов [186].

Митохондриям принадлежит центральная роль в обеспечении всех типов программированной клеточной гибели (ПГК): аутофагии, апоптоза и некрозоподобной ПГК [147]. Выбор и активизация определенной программы клеточной гибели также обеспечивается митохондриями посредством регулирования количества открытых в них пор [273, 220].

Известно, что в межмембранном пространстве митохондрий присутствуют белки, опосредующие после попадания в цитозоль реализацию программированной клеточной гибели. В частности, к таким белкам относятся прокаспаза-2, -3, -9, ингибиторы апоптоз-блокирующих факторов (Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI, Smac/DIABLO; omni high temperature requirement protein A2, Omni/HtrA2), прямые активаторы программируемой гибели клеток: цитохром С, запускающий каспазо-зависимый процесс, а также эндонуклеаза G и AIF (apoptosis-inducing

factor), опосредующие каспазо-независимую клеточную смерть [199]. Возможным механизмом выхода проапоптотических белков из межмембранного митохондриального пространства может являться образование апоптотических пор и пор повышенной проницаемости (permeability transition pores, РТР) [147]. Существует ряд внутриклеточных сигнальных систем контроля высвобождения факторов апоптоза из митохондрий, одни из которых приводят к активации, а другие — к блокированию реализации танатогенной клеточной программы. Центральная роль в регулировании процесса образования митохондриальных пор принадлежит белкам семейства Bcl-2, включающих проапоптотические (Bax, Bak, Bcl-G, Bcl-X_L, Bcl-X_S, Bcl-2, Bcl-2L1, Bcl-2L2, Bcl-2L3, Bcl-2L4, Bcl-2L5, Bcl-2L6, Bcl-2L7, Bcl-2L8, Bcl-2L9, Bcl-2L10, Bcl-2L11, Bcl-2L12, Bcl-2L13, Bcl-2L14, Bcl-2L15, Bcl-2L16, Bcl-2L17, Bcl-2L18, Bcl-2L19, Bcl-2L20, Bcl-2L21, Bcl-2L22, Bcl-2L23, Bcl-2L24, Bcl-2L25, Bcl-2L26, Bcl-2L27, Bcl-2L28, Bcl-2L29, Bcl-2L30, Bcl-2L31, Bcl-2L32, Bcl-2L33, Bcl-2L34, Bcl-2L35, Bcl-2L36, Bcl-2L37, Bcl-2L38, Bcl-2L39, Bcl-2L40, Bcl-2L41, Bcl-2L42, Bcl-2L43, Bcl-2L44, Bcl-2L45, Bcl-2L46, Bcl-2L47, Bcl-2L48, Bcl-2L49, Bcl-2L50, Bcl-2L51, Bcl-2L52, Bcl-2L53, Bcl-2L54, Bcl-2L55, Bcl-2L56, Bcl-2L57, Bcl-2L58, Bcl-2L59, Bcl-2L60, Bcl-2L61, Bcl-2L62, Bcl-2L63, Bcl-2L64, Bcl-2L65, Bcl-2L66, Bcl-2L67, Bcl-2L68, Bcl-2L69, Bcl-2L70, Bcl-2L71, Bcl-2L72, Bcl-2L73, Bcl-2L74, Bcl-2L75, Bcl-2L76, Bcl-2L77, Bcl-2L78, Bcl-2L79, Bcl-2L80, Bcl-2L81, Bcl-2L82, Bcl-2L83, Bcl-2L84, Bcl-2L85, Bcl-2L86, Bcl-2L87, Bcl-2L88, Bcl-2L89, Bcl-2L90, Bcl-2L91, Bcl-2L92, Bcl-2L93, Bcl-2L94, Bcl-2L95, Bcl-2L96, Bcl-2L97, Bcl-2L98, Bcl-2L99, Bcl-2L100) и антиапоптотические факторы (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, Bcl-B, Mcl-1). Кроме того, значительный эффект на проницаемость митохондриальной мембраны оказывают цитоплазматические ионы Ca^{2+} и АФК [199].

Проведенные исследования показали, что для ДНК, выделенной из клеток полушарий головного мозга крыс с ИРГМ, была характерна фрагментация, степень которой была несколько менее выражена после инъекций мелаксена (рис. 9).

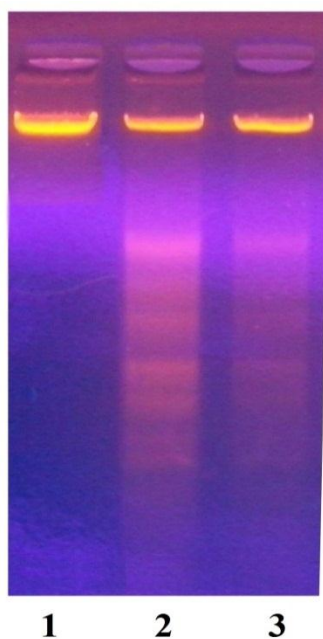


Рис. 9. Степень фрагментации ДНК из клеток мозга ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2) и животных, получавших на фоне развития патологии инъекции мелаксена в дозе 10 мг/кг (3).

Как известно, фрагментация молекул ДНК является маркером активизации апоптоза. Одним из ключевых событий в данном процессе является включение белков семейства Bcl2, таких как Bax, Bad и Bak, во внешнюю митохондриальную мембрану [246], следствием чего является высвобождение проапоптотических белков цитохрома c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 и эндонуклеазы-G (эндо-G) из межмембранного пространства. Цитохром c связывается с цитозольным белком APAF1, запуская сборку апоптосомы с активацией системы протеаз, что приводит к расщеплению клеточного белка. Характерная для этой формы апоптоза фрагментация ДНК опосредуется эндо-G [165]. Из литературных данных известно, что стимуляция протеинов Bcl2 и их транслокация и интеграция в митохондриальные мембраны происходит в ишемических клетках. Однако самой по себе ишемии может быть не достаточно для активации белков Bcl2, поскольку многие члены данного семейства чувствительны к окислительно-восстановительному воздействию, для чего необходима индукция окислительного стресса, вызванного реперфузией [165]. Воздействие свободных радикалов на клетку может также способствовать запуску апоптоза посредством таких механизмов, как формирование митохондриальных пор проницаемости и выход цитохрома c, инактивация кальциевой АТФазы и накопление Ca^{2+} в цитоплазме, приводящие к нарушению мембранного потенциала митохондрий, окислительное повреждение ДНК и активация транскрипционного проапоптотического фактора p53 [183].

3.2. Воздействие мелаксена на активность каспаз при ишемии/реперфузии головного мозга у крыс

Ключевыми протеолитическими ферментами, реализующими программу апоптоза, являются каспазы. Результаты исследования показали, что в мозге животных второй экспериментальной группы активность каспазы-3 и каспазы-8 увеличивалась относительно контроля на 67% и 66% соответственно (рис. 10). Введение мелаксена на фоне развития ИРГМ способствовало снижению активности каспазы-3 и каспазы-8 на 32% и 37% относительно животных второй экспериментальной группы (см. рис. 10).

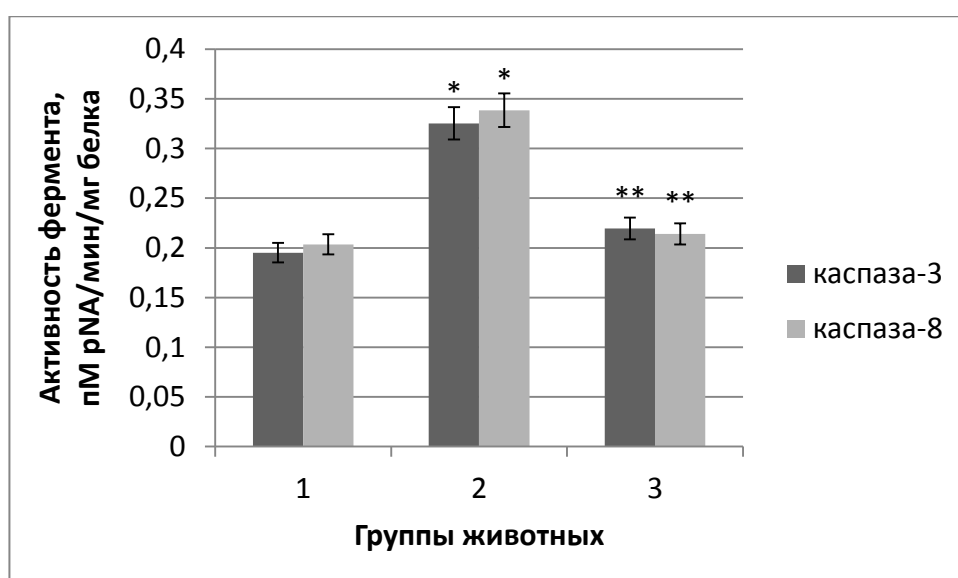


Рис. 10. Активность каспазы-3 и каспазы-8 в мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена 10 мг/кг (3). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

Как показали результаты работы, индукция ИРГМ, помимо увеличения степени фрагментации ДНК, была сопряжена с возрастанием активности каспаз 3 и 8. В основе таких явлений может лежать ряд процессов. Связывание лигандов, таких как Fas, TRAIL и TNF- α , с провоспалительными рецепторами приводит к их тримеризации. Это способствует

рекрутированию адаптивных белков, содержащих домены смерти (например, FADD и TRADD), для формирования комплекса сигнализации, вызывающего клеточную смерть. После сборки этот рецепторный комплекс запускает каспазу-8, протеазу, которая активирует каспазу-3 ограниченным протеолизом. Каспаза-3 гидролизует многие клеточные белки, вызывая апоптоз [165]. Имеются также данные о том, что FOXO1, уровень мРНК которого был повышен у животных второй группы, запускает в ответ на окислительный стресс экспрессию генов, связанных с апоптозом, включая Bim, FasL, Puma и TRAIL, и индуцирует гибель нейронов при нейродегенеративных заболеваниях [233]. Вместе с тем, как было показано в ходе работы, мелаксен способствовал уменьшению выраженности апоптотических процессов у животных с ИРГМ, что могло быть связано с увеличением в организме экспериментальных животных уровня мелатонина, отражавшимся в возрастании концентрации мелатонинсульфата в моче крыс в 1,5 раза относительно показателей при патологии. В настоящее время имеются литературные сведения о наличии у мелатонина способности регулировать интенсивность апоптотических процессов. Так, известно, что модуляция экспрессии генов, опосредованная рецепторами мелатонина MT1 и MT2, может наблюдаться на физиологических уровнях. Эти эффекты противодействуют активации микроглии и образованию пероксинитрита и поддерживают нормальный транспорт электронов в митохондриях, уменьшая утечку электронов и тем самым снижая генерацию радикалов, предотвращая индуцированный оксидантами апоптоз в неопухолевых клетках [260]. Согласно имеющимся сведениям, мелатонин способен не только тормозить выделение цитохрома c и гибель клеток, но также ингибировать потерю потенциала митохондриальной мембраны, активацию каспазы-3 и каспазы-1 и апоптотические стимулы цитокина ИЛ-1 β [218]. Кроме того, введение мелатонина в культуру нейронов также снижало экспрессию E2F-1, который является проапоптотическим транскрипционным фактором [59]. Существенный вклад в предотвращение апоптоза вносят антиоксидантные

свойства мелатонина благодаря снижению степени окислительного воздействия на редокс-чувствительные белки семейства Bcl2 [302] Имеются сведения, что мелатонин усиливает экспрессию SOX2 - члена семейства факторов транскрипции SOX, экспрессирующихся в ЦНС и регулирующих пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток. SOX2 поддерживает потенциал восстановления ткани и ингибирует апоптоз и дифференцировку. Кроме того, недавно было доказано, что мелатонин тормозит старение посредством активации SIRT1 – сиртуина, который способствует выживанию путем ингибирования апоптоза или клеточного старения в клетках млекопитающих. Гормон увеличивал экспрессию SIRT1, что снижало воспалительную и апоптозную сигнализацию, связанную с p53. Аналогично этому, при моделировании старения мелатонин защищает нейроны, усиливая экспрессию SIRT1 и впоследствии уменьшая количество ацетилированной (активной) формы p53 [117]. Таким образом, было показано, что введение мелаксена приводило к подавлению окислительного стресса, уменьшению степени индукции воспаления и гипоксии, что может быть объяснено с точки зрения существующих воззрений. По-видимому, данные обстоятельства, наряду со снижением активности апоптотических процессов, обеспечивали существенный вклад в нейропротекцию животных, получавших инъекции синтетического аналога гормона.

ГЛАВА 5. ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕЛАТОНИН-КОРРИГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КОМПОНЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

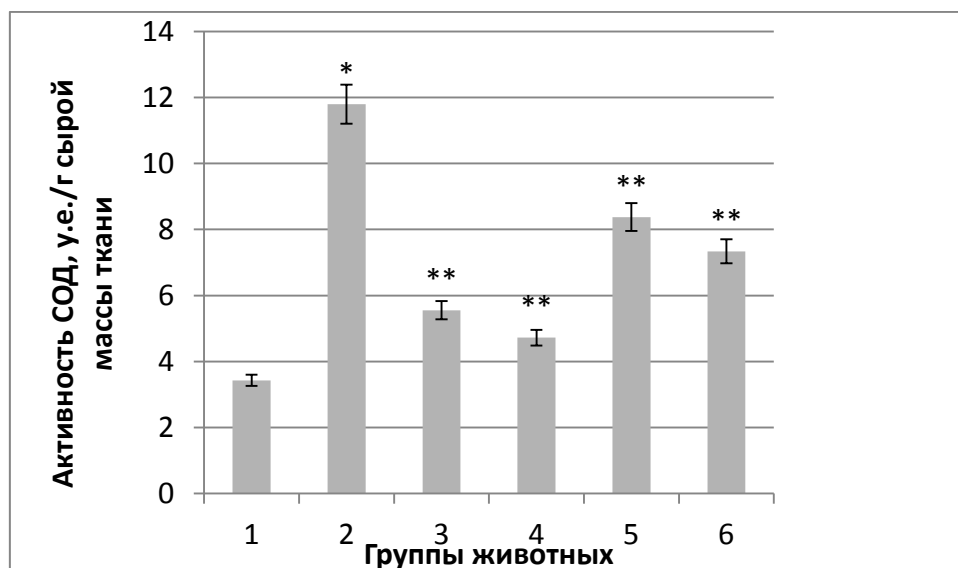
5.1. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на функционирование супероксиддисмутазы и каталазы в тканях крыс с ишемией/реперфузией головного мозга

Быстрота и опасность развития окислительного стресса в ЦНС определяются высокой интенсивностью обменных процессов и относительной недостаточностью АОС в мозге [3]. Как известно, его масса составляет около 2% от общей массы тела человека, при этом он утилизирует до 50% всего поступающего кислорода, интенсивность потребления которого нейронами достигает 350–450 мкл O_2 /мин. Наряду с этим, активность ряда ферментов АОС, таких как ГП и каталаза, в мозге ниже по сравнению с другими органами. Уменьшение количества поступающего в нейроны молекулярного кислорода, а также увеличение степени восстановленности компонентов электрон-транспортной цепи способствуют неполному восстановлению кислорода, сопровождающемуся образованием свободных радикалов ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet}) [3].

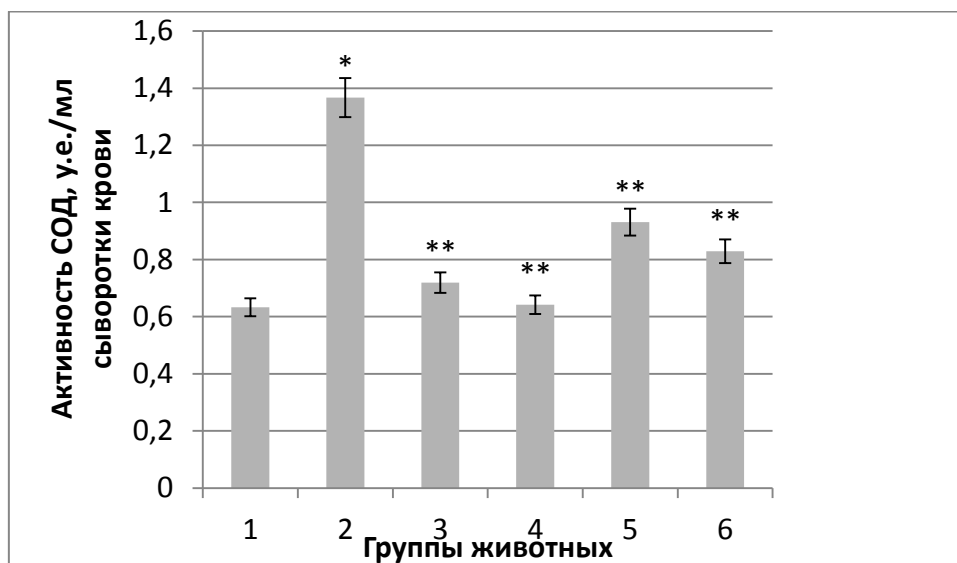
Функцию первичной защиты от одного из ключевых патогенетических факторов ишемии/реперфузии – окислительного стресса, выполняют антиоксидантные ферменты супероксиддисмутаза (СОД), которая обезвреживает $O_2^{\bullet-}$ до кислорода и H_2O_2 , и каталаза, превращающая H_2O_2 в воду и кислород [131]. Таким образом, два этих фермента функционируют в качестве системы нейтрализации первичных АФК – $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 , и выполняют ключевую роль в защите клеток от эндогенных радикалов, возникающих в клетке в первую очередь и способных приводить к формированию более реакционноспособных форм [82]. Кроме того, для СОД и каталазы не

характерно использование кофакторов, что определяет их независимое от активности других компонентов клетки функционирование [34, 294].

В ходе проведенных ранее исследований было показано, что моделирование ИРГМ у крыс сопровождалось возрастанием активности антиоксидантных ферментов [6]. Так, активность СОД и каталазы, представленная в виде Е/г сырой массы ткани мозга, увеличивалась относительно контроля в 3,4 и 2,4 раза. В пересчете на мл сыворотки крови активность данных ферментов также возрастала – в 2,2 и 2,6 раза относительно показателей ложнооперированных животных (рис. 11, 12). Схожим образом изменялась и удельная активность СОД и каталазы в условиях развития патологии (рис. 13, 14). Введение мелатонин-корректирующих препаратов приводило к сдвигу исследуемых показателей в направлении контрольных значений. Наиболее мощный эффект при этом наблюдался после введения мелаксена в дозе 10 мг/кг, приводившего к 2,5- и 1,9-кратному уменьшению активности СОД и каталазы в мозге животных по сравнению с показателями второй группы. Активность данных ферментов, представленная в виде Е/мл сыворотки, снижалась в 2,1 и 2,5 раза (см. рис. 11, 12). Изменения удельной активности СОД и каталазы после введения тестируемых препаратов на фоне ИРГМ обладали схожей динамикой (см. рис. 13, 14). Значимых изменений активности антиоксидантных ферментов относительно контрольных животных у крыс 7 и 8 группы не наблюдалось.



А



Б

Рис. 11. А. Активность супероксиддисмутазы в виде Е/г сырой массы ткани мозга ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$. Б. Активность супероксиддисмутазы в виде Е/мл сыворотки крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

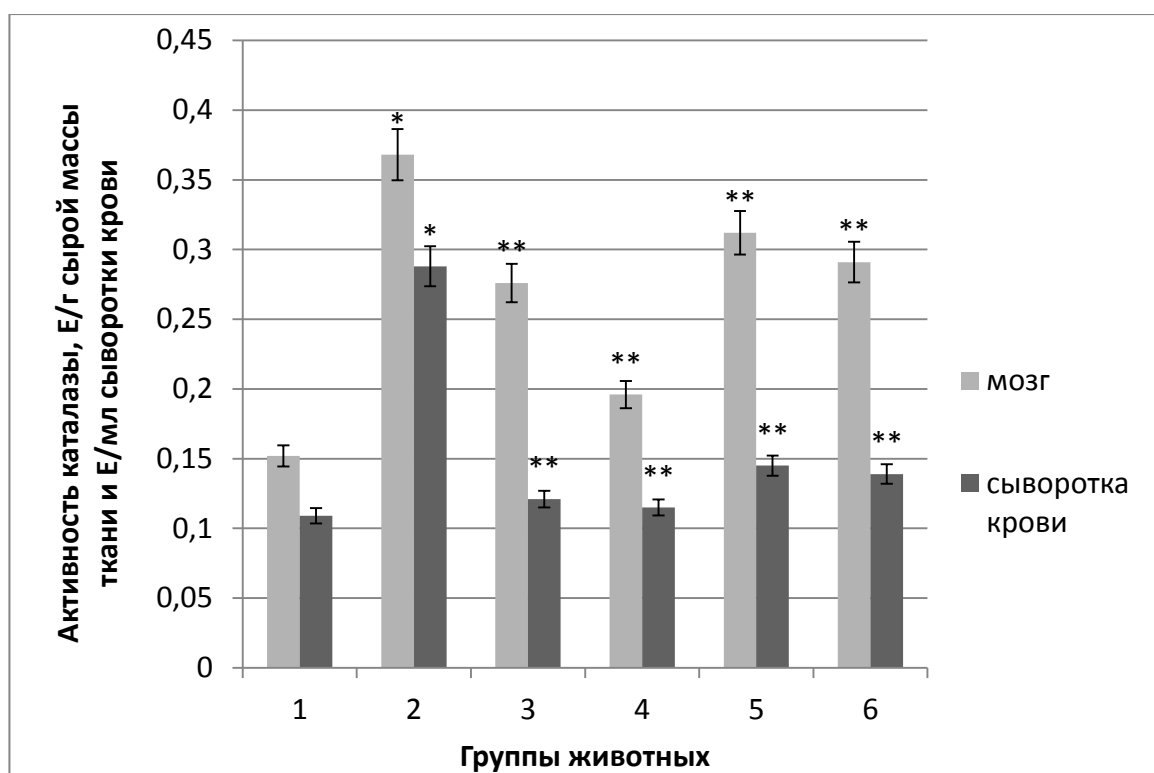
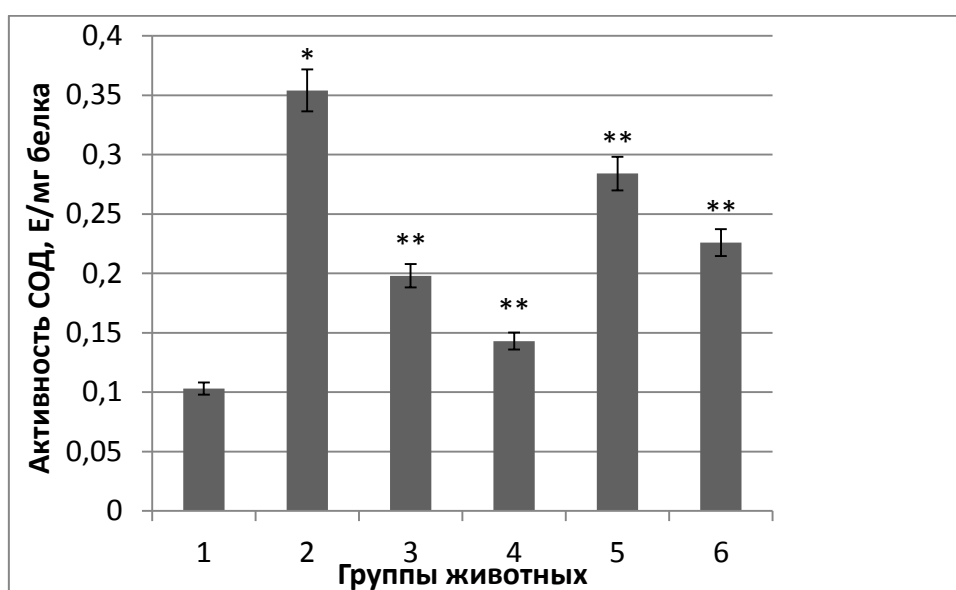
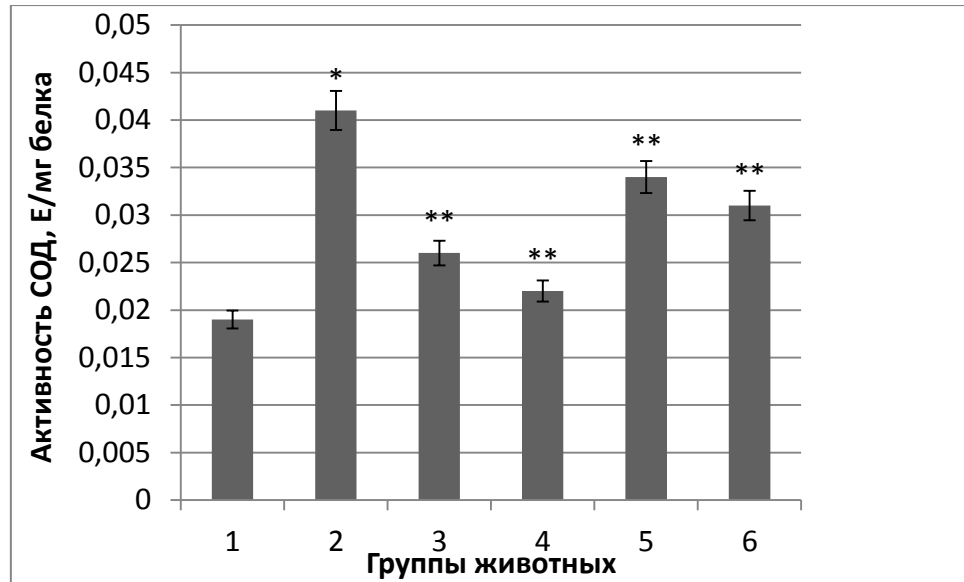


Рис. 12. Активность каталазы в виде Е/г сырой массы ткани мозга и Е/мл сыворотки крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

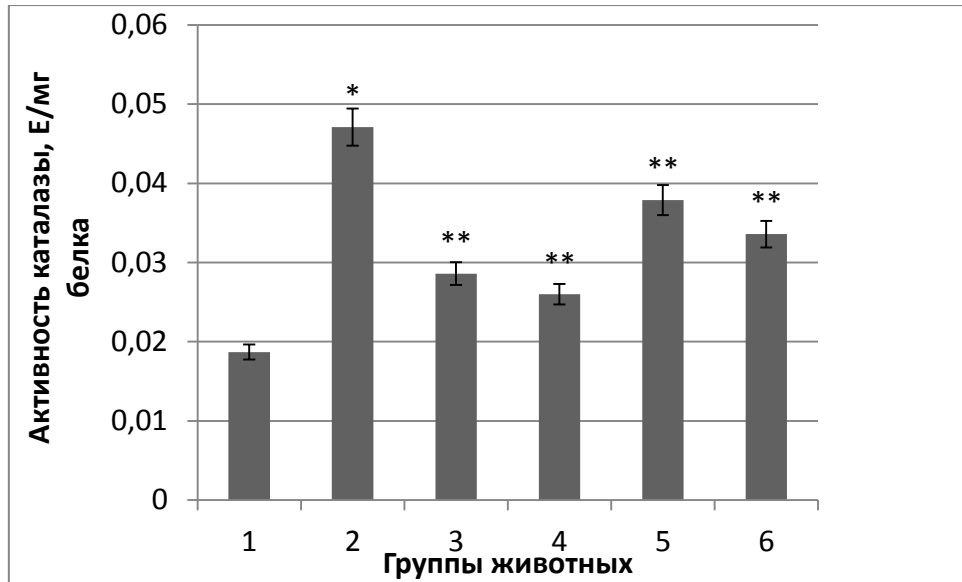


А

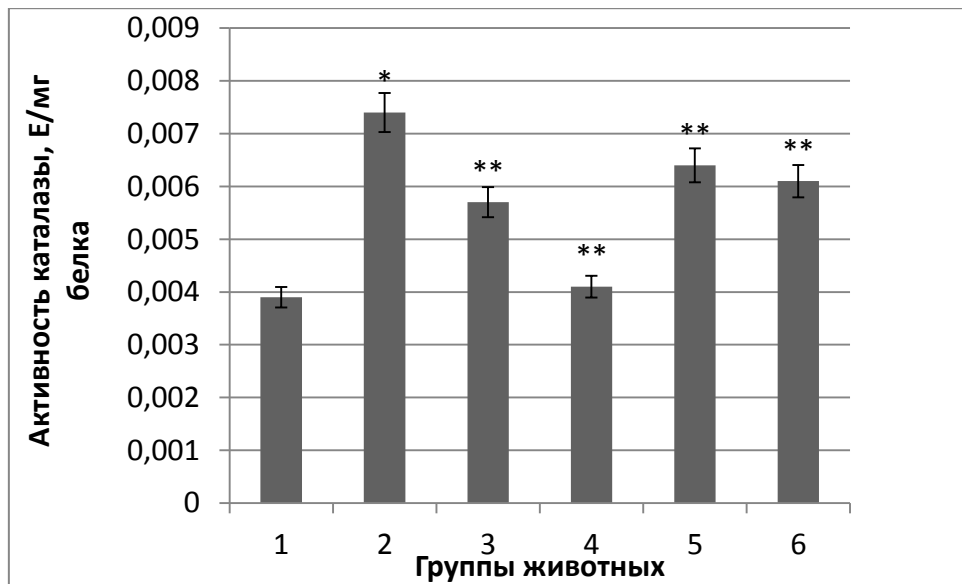


Б

Рис. 13. А. Удельная активность супероксиддисмутазы в мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$. Б. Удельная активность супероксиддисмутазы в сыворотке крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.



А



Б

Рис. 14. А. Удельная активность каталазы в мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$. Б. Удельная активность каталазы в сыворотке крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии

инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

Наряду с возрастанием активности ферментов, при ИРГМ у крыс происходило накопление транскриптов генов *SOD1* и *CAT*. Так, в мозге животных второй экспериментальной группы данные показатели возрастали в 2,2 и 1,8 раза относительно контроля. Введение мелаксена в дозе 10 мг/кг на фоне ИРГМ приводило, в свою очередь, к снижению исследуемых параметров соответственно в 1,2 и 1,5 раза. Использование в качестве протектора эпифамина в дозе 2,5 мг/кг способствовало снижению уровня транскриптов *SOD1* и *CAT* в 1,2 и 1,4 раза, относительно значений животных второй группы (рис. 15).

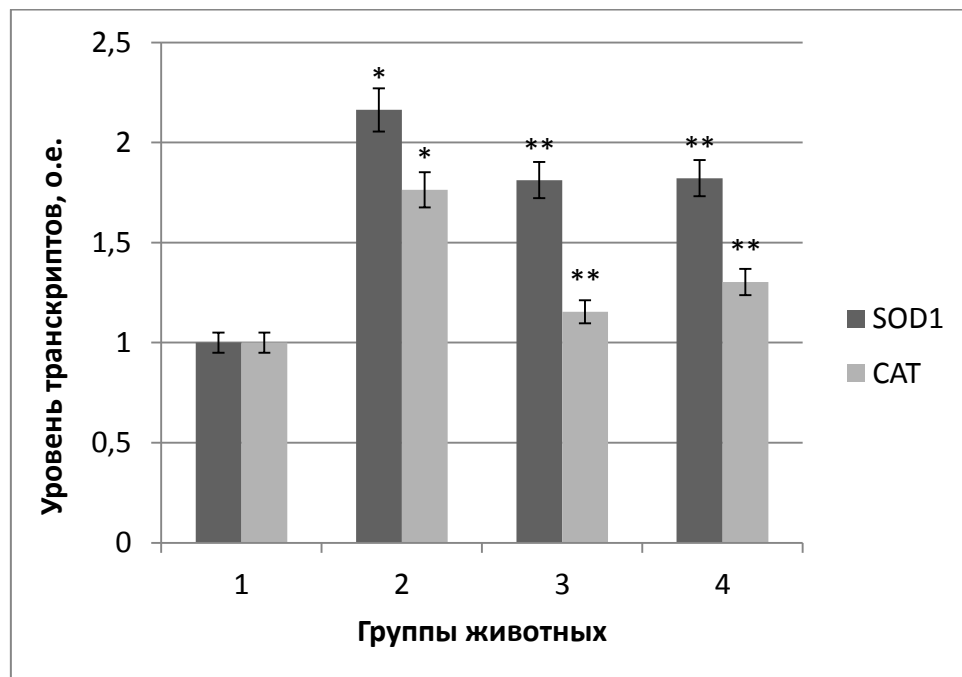


Рис. 15. Уровень транскриптов генов *SOD1* и *CAT* в мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 10 мг/кг (3), и эпифамина в дозе 2,5 мг/кг (4). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

По всей видимости, активизация исследуемых компонентов антиокислительной защиты носила адаптивный характер и происходила вследствие развития одного из существенных звеньев патогенеза ишемии и реперфузии – окислительного стресса. В условиях снижения рН среды происходит усиленная генерация продуктов ПОЛ и активация окислительного стресса [190]. Так, среди основных факторов чрезмерной генерации АФК, приводящей к сдвигу про- и антиокислительного баланса при ИРГМ, можно выделить нарушение функционирования компонентов дыхательной цепи митохондрий, активацию НАДФН-оксидазы, индицирующейся в ходе воспалительной реакции, а также наличие в большом количестве свободных ионов Fe^{2+} [78]. К источникам свободных радикалов в условиях развития ишемии и реперфузии можно также отнести гипоксантин – субстрат ксантинооксидазы, образующийся при деградации АТФ, обусловленной снижением кислотности, и вышедший из митохондрий цитохром С. Накопление АФК, в том числе за счет высвобождения ионов железа, связанных с трансферрином, приводит к повреждению митохондрий и ингибированию цитохромов $a-a_3$, а также цитохромоксидазы [277]. Вследствие этого происходит прогрессирующее понижение содержания в головном мозге макроэргов и накопление АМФ, вследствие чего активизируется протеинкиназная система и усугубляются деструктивные процессы на мембранах клеток [72]. При гипоксии АФК способны образовываться и другими путями: за счет действия фагоцитов, рекрутируемых в область ишемизации, в процессе метаболизма арахидоновой кислоты, вследствие активации генерации пероксинитрита [127]. При этом концентрация в тканях кислорода даже при острой ишемии является значительной и превышающей критический уровень, вследствие чего активизируется ПОЛ. Состояние окислительного стресса тесно сопряжено с процессами энергетического обмена и эксайтотоксичностью глутамата, формируя замкнутые порочные патогенетические круги.

Вместе с тем, определенный вклад в возрастание активности анализируемых ферментов в сыворотке крови экспериментальных животных могло вносить нарушение барьерных свойств клеточных мембран тканей головного мозга при развитии ишемии и реперфузии. Наблюдаемое уменьшение активности и уровня мРНК генов ферментов СОД и каталазы происходило, судя по всему, вследствие снижения нагрузки на соответствующие звенья антиоксидантной системы. Данные изменения могли происходить в условиях проявления антиокислительного эффекта мелатонином, содержание которого корректировалось мелаксенон и эпифамином, о чем свидетельствовало увеличение содержания мелатонинсульфата в моче крыс в 1,5 и 1,4 относительно значений при ИРГМ. Протекторный потенциал мелатонина заключается в его антиоксидантном действии, которое гормон способен проявлять посредством прямой нейтрализации АФК, регуляции уровня эндогенных антиоксидантов и нормализации функционирования компонентов ЭТЦ митохондрий в условиях окислительного стресса [63]. Существенный вклад в смягчение дисбаланса между про- и антиокислительными процессами мог вносить также иммуномодулирующий эффект мелатонина и его нейропротекторные свойства [214].

5.2. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на функционирование глутатионовой антиоксидантной системы в условиях развития ишемии/реперфузии головного мозга у крыс

В настоящее время не вызывает сомнений, что АФК и образованные под их действием продукты ПОЛ в посттравматическом и постишемическом периоде играют одну из ключевых ролей в патогенезе отека-набухания головного мозга и нарушений обменных процессов в мозговой ткани [36]. Образование АФК в условиях реперфузии, по-видимому, обусловлено формированием условий, располагающих к генерированию вторичных

радикалов. Парциальное давление кислорода при ишемии резко понижается, что сопровождается изменением степени окисления атомов железа Fe^{3+} в восстановленные Fe^{2+} , а также возрастанием активности ксантиноксидазы. Данные процессы при появлении в цитозоле больших количеств кислорода в при реперфузии резко индуцируют генерацию $OH\cdot$. При этом, повреждение клеточных структур, обусловленное действием данного радикала, может приобретать необратимый характер с активацией процесса апоптоза.

Продолжительная гипоксия обуславливает также значительные изменения активности некоторых клеточных ферментов, истощение и нарушение функционирования компонентов АОС клетки, быстрое восстановление комплексов электрон-транспортной цепи, сопряженное с обращением АТФ-синтетазной реакции, необходимым для формирования протонного градиента при дефиците кислорода. Результатом всех этих изменений является утечка электронов с комплексов электрон-транспортной цепи и неполное восстановление кислорода при последующей реоксигенации [192].

В условиях же нормоксии усиленное образование АФК, сопряженное с окислительным стрессом, происходит, как правило, только в очагах воспаления [37]. При этом процесс образования АФК связан с функциональной активностью макрофагов, обладающих НАДФН-оксидазной системой, и является жестко регулируемым, оказывая разрушающее действие только на клетки, являющиеся мишенями иммунного ответа.

Важную роль в лимитировании скорости СО выполняет GSH, обеспечивающий основную защиту от ПОЛ путем отдачи восстановительного эквивалента на органические гидропероксиды с помощью ГП или ГТ. При этом он становится реактивным и легко реагирует с другим реакционноспособным глутатионом с образованием GSSG. GSSG восстанавливается обратно до GSH с помощью ГР через НАДФН-зависимую реакцию, замыкая окислительно-восстановительный цикл. GSSG также

может активно экспортироваться из клетки или реагировать с белковой тиоловой группой, образуя смешанные дисульфиды с белками [125].

Как показали проведенные исследования, развитие ИРГМ у крыс сопровождалось увеличением активности ГП, ГР и ГТ, представленной в Е/г сырой массы ткани мозга, в 3,3, 4,2 и 5,8 раза, относительно контрольных показателей [28]. Активность данных ферментов, выраженная в Е/мл сыворотки крови, возрастала при этом соответственно в 1,9, 3,4 и 2,3 раза (рис. 16). Удельная активность ГП, ГР и ГТ изменялась при развитии патологии схожим образом (рис. 17). При ИРГМ происходило также 2- и 2,2-кратное возрастание концентрации GSH в мозге и сыворотке крови лабораторных животных (рис. 18). Наряду с изменениями активности ферментов глутатионовой системы, ИРГМ сопровождалась возрастанием уровней транскриптов генов *GPX1* и *GSR*. Так, данные показатели увеличивались в мозге крыс в 1,9 и 1,2 раза относительно контроля (рис. 19). По-видимому, мобилизация глутатионового звена АОС носила компенсаторный характер в ответ на чрезмерное образование АФК в условиях ИРГМ.

Окислительный стресс, вызванный развитием моделируемой патологии, может обеспечить формирование условий, благоприятных для превращения относительно нетоксичной молекулы H_2O_2 в OH^\bullet или гипохлорит-анион (OCl^-) под действием фермента миелопероксидазы. Оба этих радикала представляют собой сильные окислители, способные модифицировать молекулы белков, нуклеиновых кислот, активировать процесс ПОЛ с участием полиненасыщенных жирных кислот – компонентов липидной части клеточных мембран. В ходе ПОЛ радикал, например OH^\bullet , способный проникать в биомембраны благодаря отсутствию заряда, отщепляет от молекулы жирной кислоты атом водорода, при этом образуется пероксидный радикал жирной кислоты. Генерированный радикал вступает в новую реакцию с другой молекулой жирной кислоты, инициируя цепную реакцию:



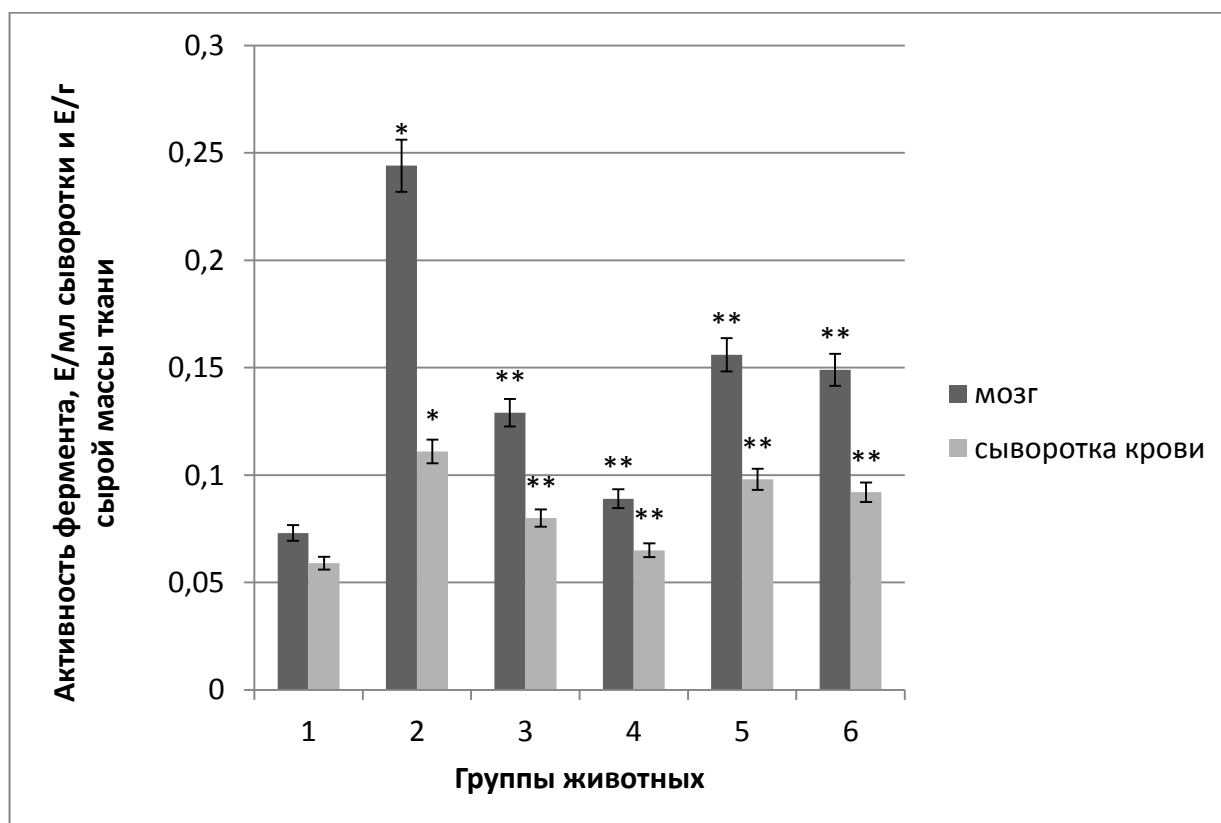
и так далее. В результате подобных взаимодействий окисляется значительное количество клеточных липидов, что приводит к повреждению мембраны. Помимо этого, может происходить и разветвление цепи окисления липидов за счет разложения гидропероксидов на два новых радикала, каждый из которых инициирует свою цепь [54].

Большое значение в рамках концепции окислительного стресса имеет процесс АФК-индуцированной генерации АФК [265]. Согласно данному положению, небольшое количество индуцирующих АФК вызывают снижение трансмембранного потенциала и приводят к интенсивному образованию вторичных АФК, приводя к формированию «окислительного взрыва». По-видимому, в процессе АФК-индуцированной генерации АФК окисляется ряд белков и регуляторных тиолов, способных влиять на редокс-статус клетки, обуславливая неспецифическую проницаемость биомембран. Данное изменение проницаемости имеет обратимый характер, но, однако, способно приводить к нарушению работы дыхательной цепи, свойств мембран и, в итоге, к «окислительному взрыву» [192].

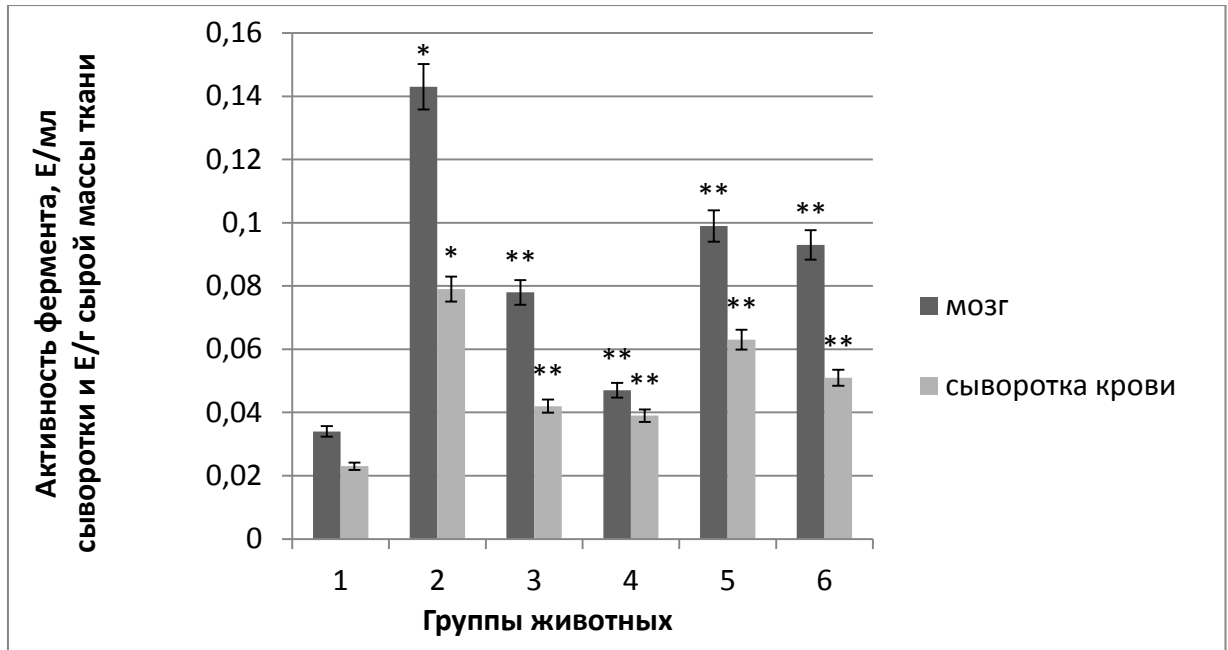
Введение мелатонин-корректирующих препаратов на фоне ИРГМ приводило к нормализации анализируемых параметров. Как и в предыдущих случаях, наиболее эффективное воздействие оказывал мелаксен в дозе 10 мг/кг веса тела животного. Так, инъекции данного препарата способствовали уменьшению активности ГП, ГР и ГТ, представленной в Е/г массы ткани мозга животных, в 2,7, 3,0 и 4,6 раза, относительно показателей второй экспериментальной группы. В сыворотке крови в данных условиях активность ГП, выраженная в Е/мл, снижалась в 1,7 раза, а ГР и ГТ – в 2,0 раза (см. рис. 16). Изменения удельной активности ферментов под действием мелатонин-корректирующих препаратов носили схожий характер и были отражены на рис. 17. Концентрация GSH под воздействием тестируемых соединений изменялась в направлении контрольных значений, а при

введении мелаксена в дозе 10 мг/кг практически возвращалась к показателю контрольной группы (см. рис. 18).

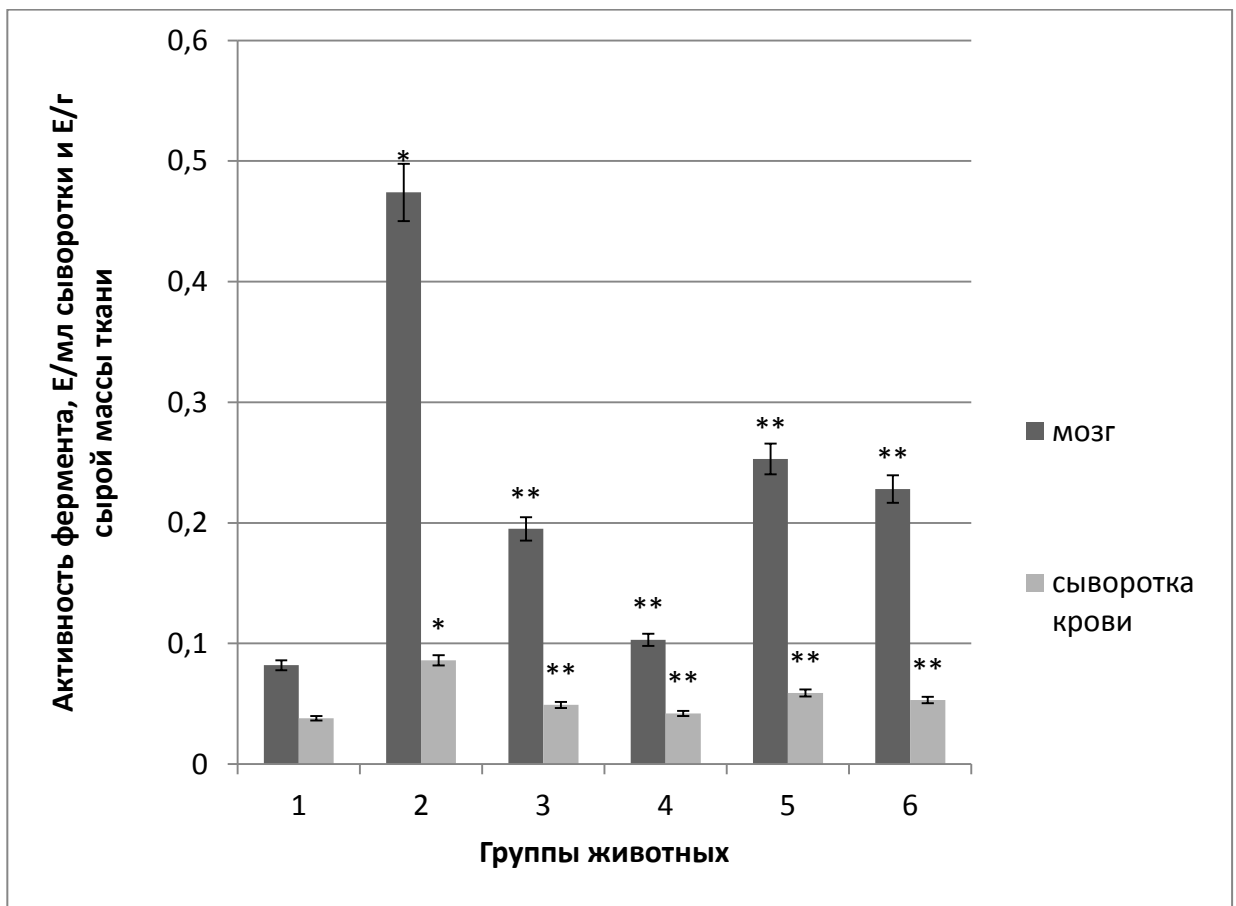
Введение на фоне развития патологии мелаксена в дозе 10 мг/кг и эпифамина в дозе 2,5 мг/кг приводило к снижению уровня мРНК гена *GPX1* на 13 и 20%, содержание мРНК гена *GSR* при этом уменьшалось незначительно (см. рис. 19). Судя по всему, ослаблению степени компенсаторной гиперфункции защитной глутатионовой системы на фоне ИРГМ способствовали нейропротекторный и антиоксидантный эффекты мелатонина, уровень которого у лабораторных животных подвергался корректировке в условиях введения мелаксена и эпифамина.



А



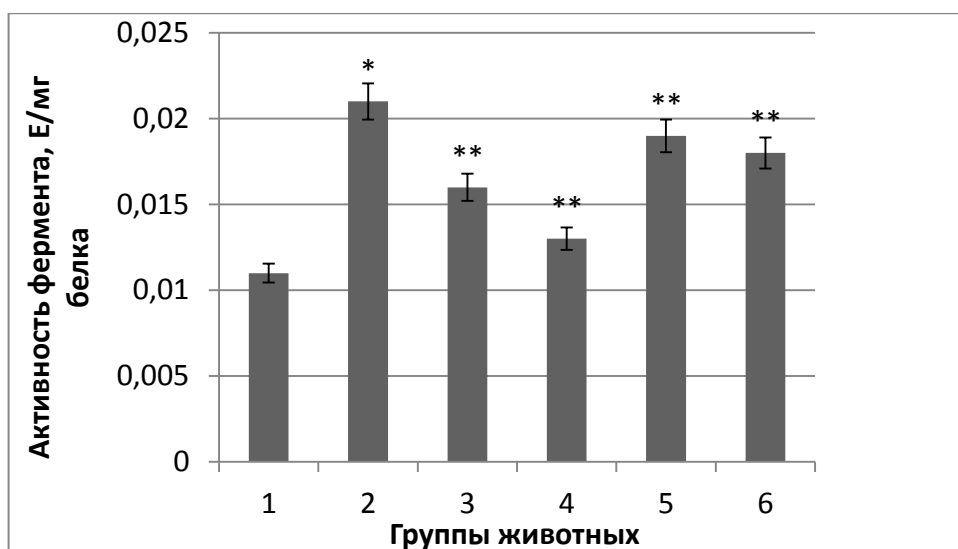
Б



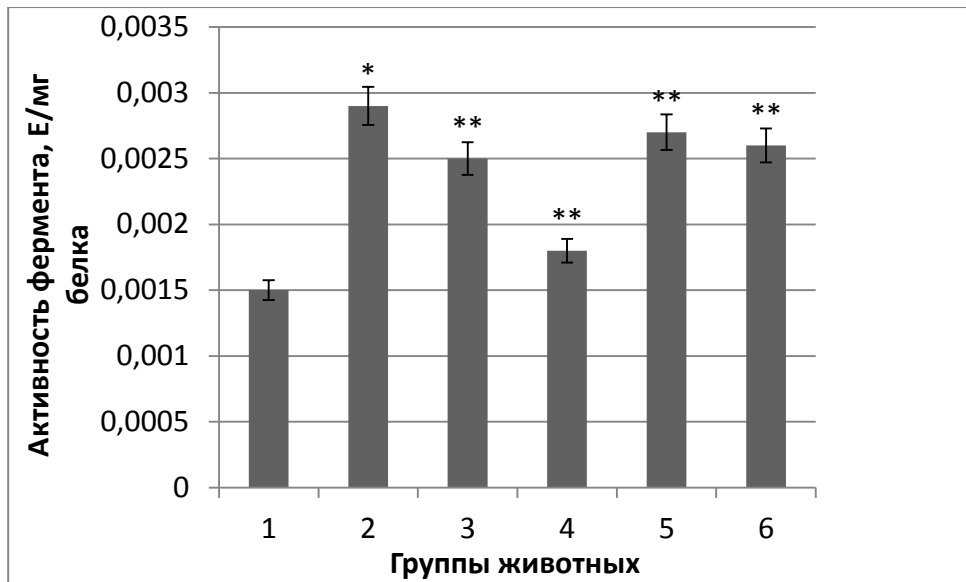
В

Рис. 16. А. Активность глутатионпероксидазы в виде Е/г сырой массы ткани мозга и Е/мл сыворотки крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных,

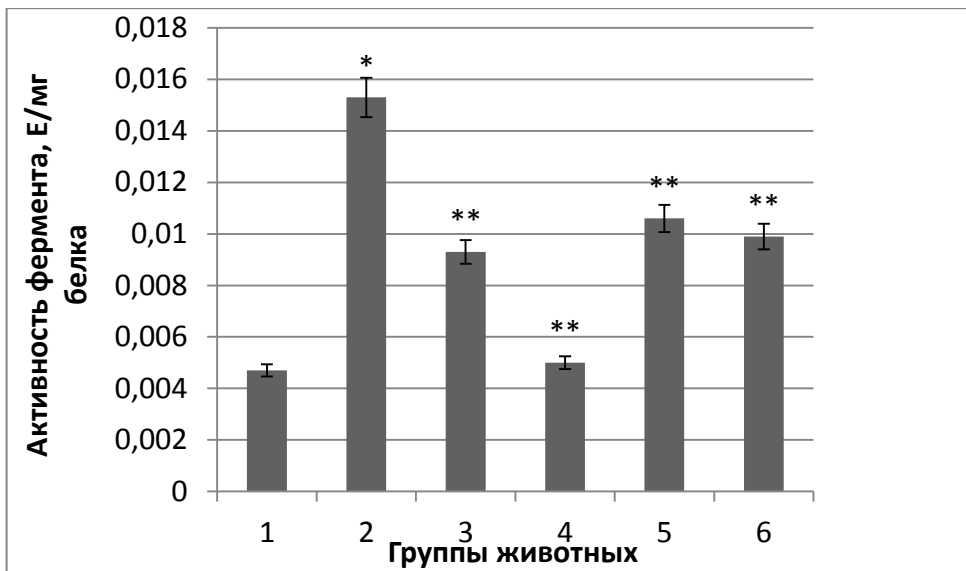
подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$. Б. Активность глутатионредуктазы в виде Е/г сырой массы ткани мозга и Е/мл сыворотки крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$. В. Активность глутатионтрансферазы в виде Е/г сырой массы ткани мозга и Е/мл сыворотки крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.



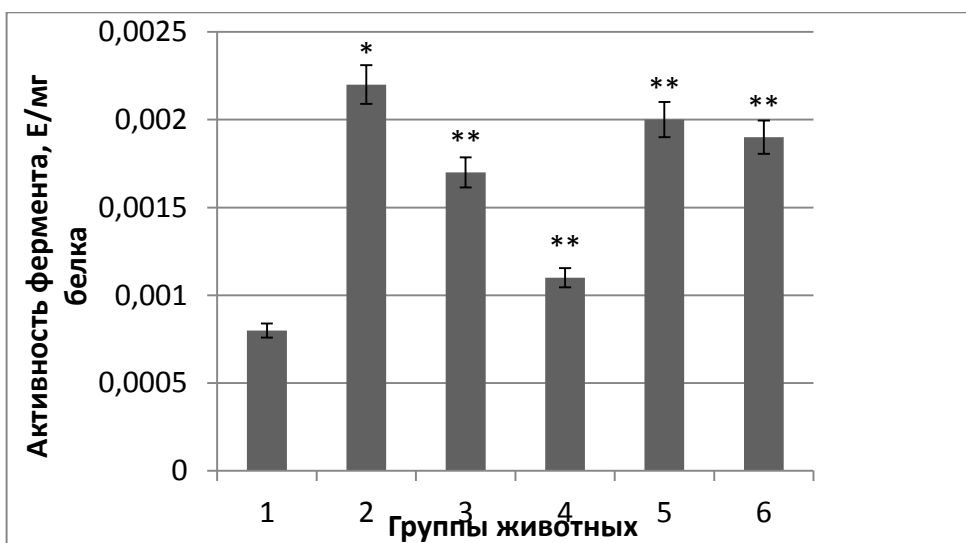
А



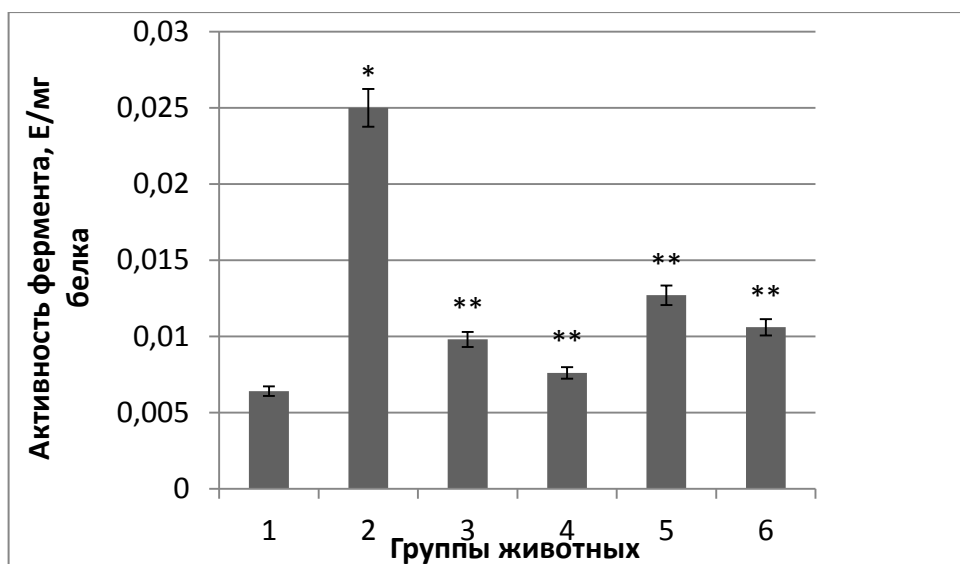
Б



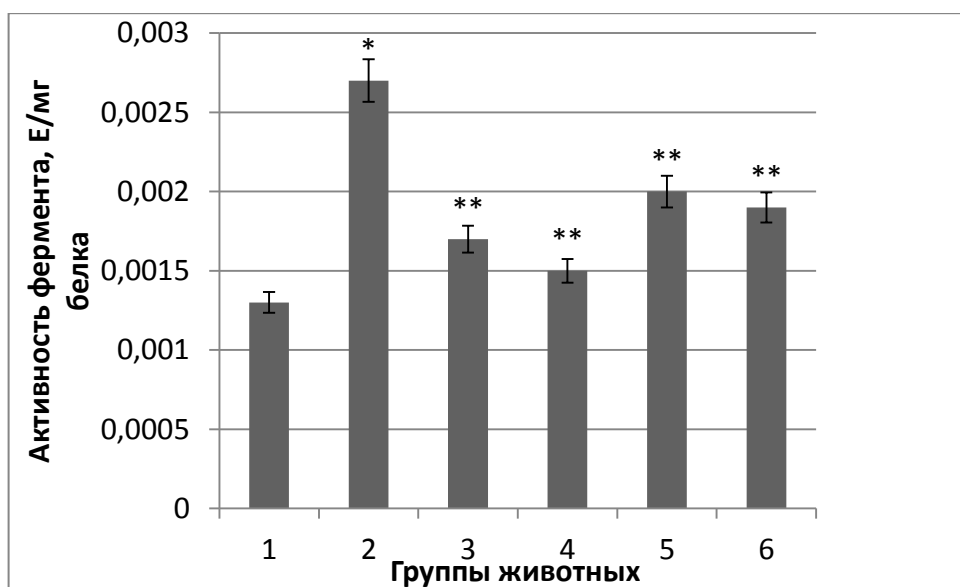
В



Г



Д



Е

Рис. 17. А. Удельная активность глутатионпероксидазы в мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$. Б. Удельная активность глутатионпероксидазы в сыворотке крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии

инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

В. Удельная активность глутатионредуктазы в мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

Г. Удельная активность глутатионредуктазы в сыворотке крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

Д. Удельная активность глутатионтрансферазы в мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

Е. Удельная активность глутатионтрансферазы в сыворотке крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

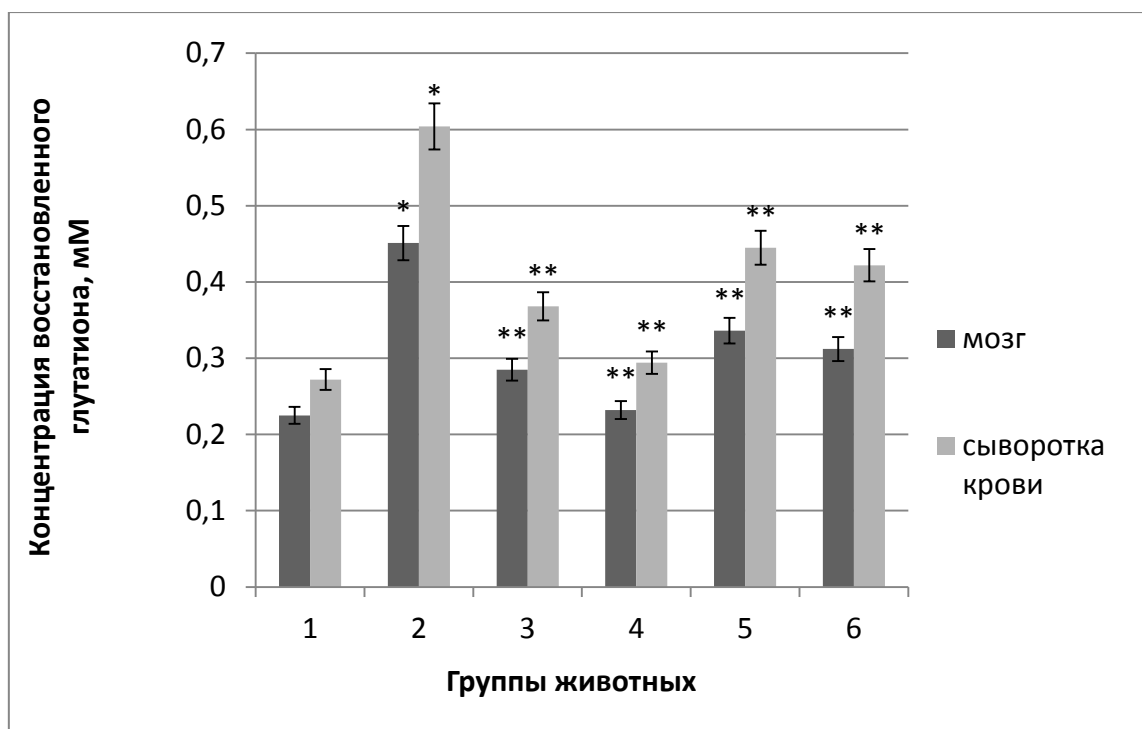


Рис. 18. Концентрация восстановленного глутатиона в мозге и сыворотке крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

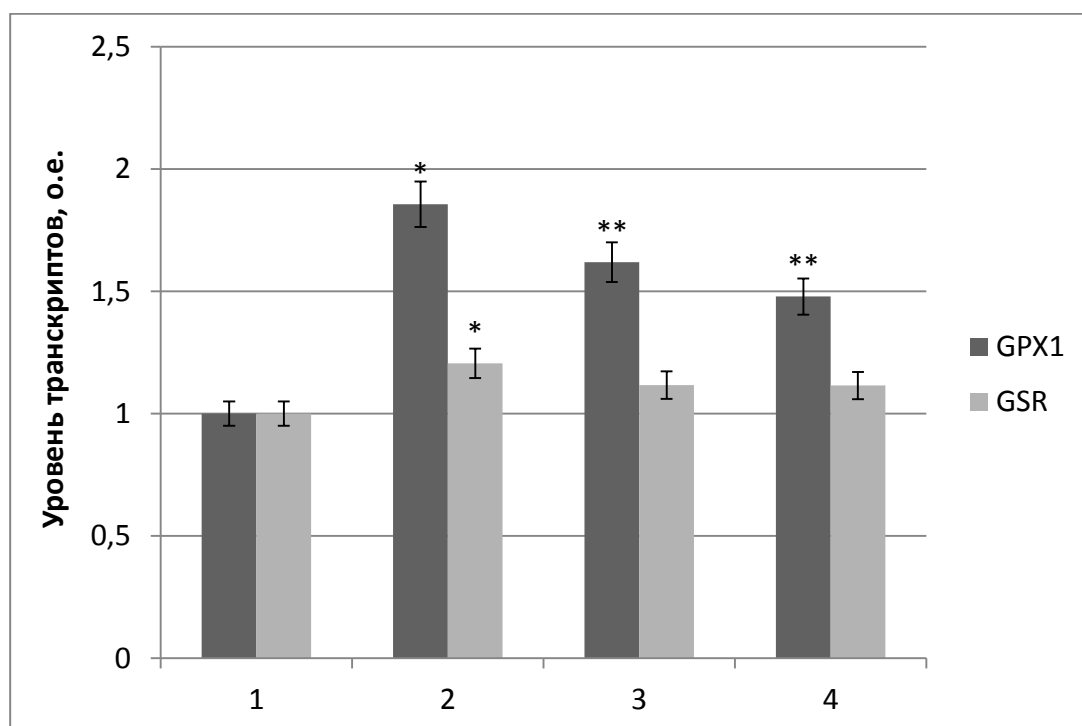


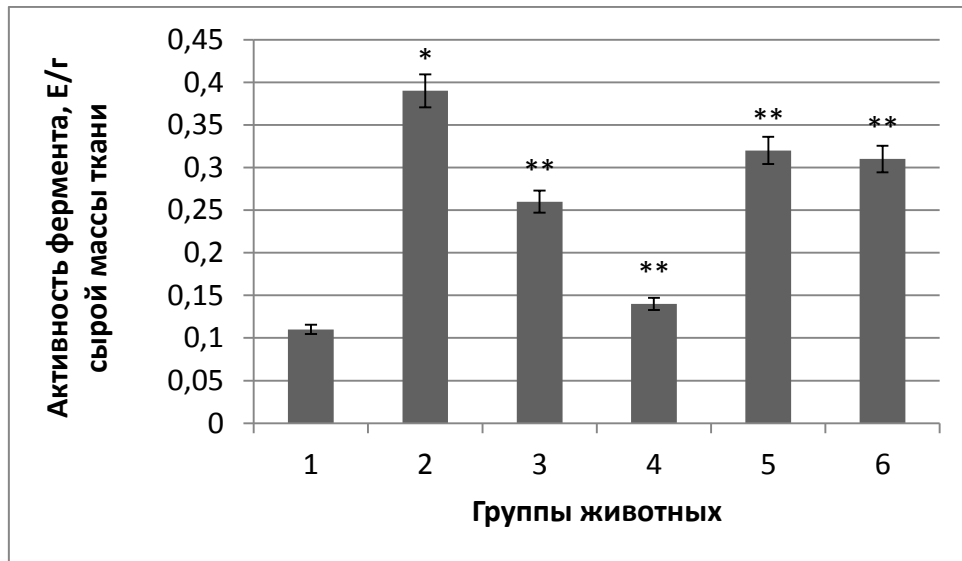
Рис. 19. Уровень транскриптов генов *GPX1* и *GSR* в мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 10 мг/кг (3), и эпифамина в дозе 2,5 мг/кг (4). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

5.3. Воздействие мелаксена и эпифамина на активность ферментов-поставщиков НАДФН для глутатионовой антиоксидантной системы

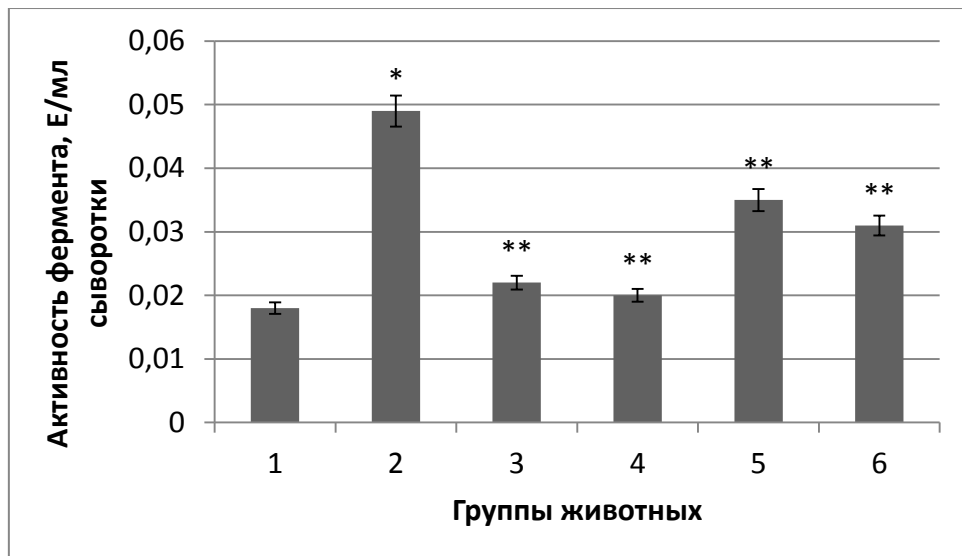
В ходе функционирования глутатионовой АОС происходит окисление GSH в ГП-реакции и последующее восстановление GSSG под действием ГР. В качестве восстановительного эквивалента для регенерации GSSG выступает НАДФН, основными поставщиками которого являются ферменты Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ.

Как показали проведенные ранее исследования, индукция ИРГМ была сопряжена с активизацией работы данных ферментов [42]. Вместе с тем, введение мелатонин-корректирующих препаратов способствовало сдвигу активности исследуемых ферментов в направлении контроля. Наиболее выраженный эффект наблюдался при инъекциях мелаксена в дозе 10 мг/кг, на фоне которых активность Г6ФДГ, представленная в Е/мл сыворотки крови и Е/г сырой массы ткани мозга снижалась в 2,5 и 2,8 раза относительно показателей при ИРГМ. Активность НАДФ-ИДГ в данных условиях уменьшалась соответственно в 2,1 и 2,8 раза (рис. 20). Схожая динамика была характерна и для удельной активности исследуемых ферментов (рис. 21). Судя по всему, наблюдаемые изменения были обусловлены снижением потребности в НАДФН вследствие уменьшения нагрузки на глутатионовую АОС. Происходящие изменения могли иметь место в условиях проявления антиоксидантного действия мелатонином, уровень которого возрастал в условиях корректирующего воздействия мелаксена и эпифамина, о чем

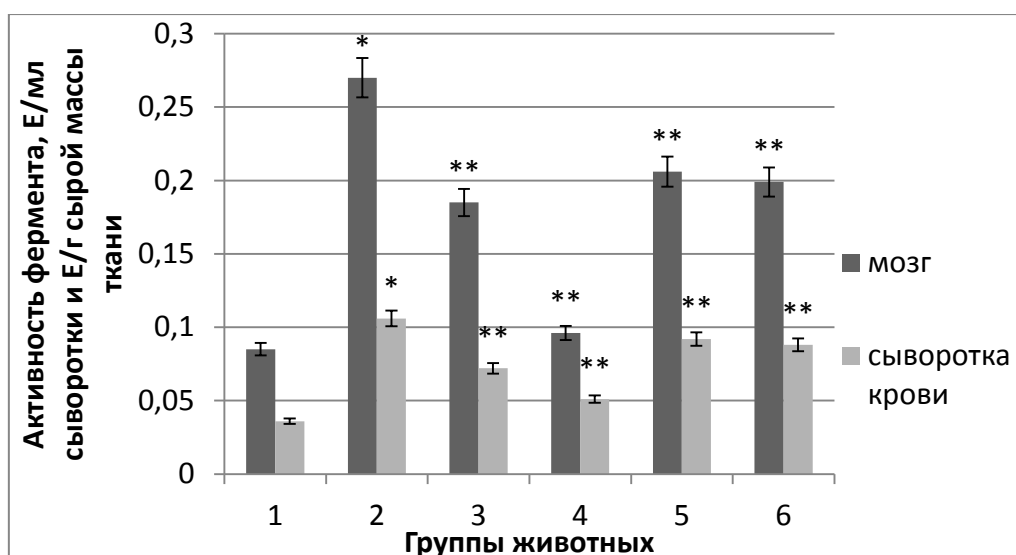
свидетельствовало увеличение содержания мелатонинсульфата в моче крыс по сравнению с показателями при развитии патологии.



А

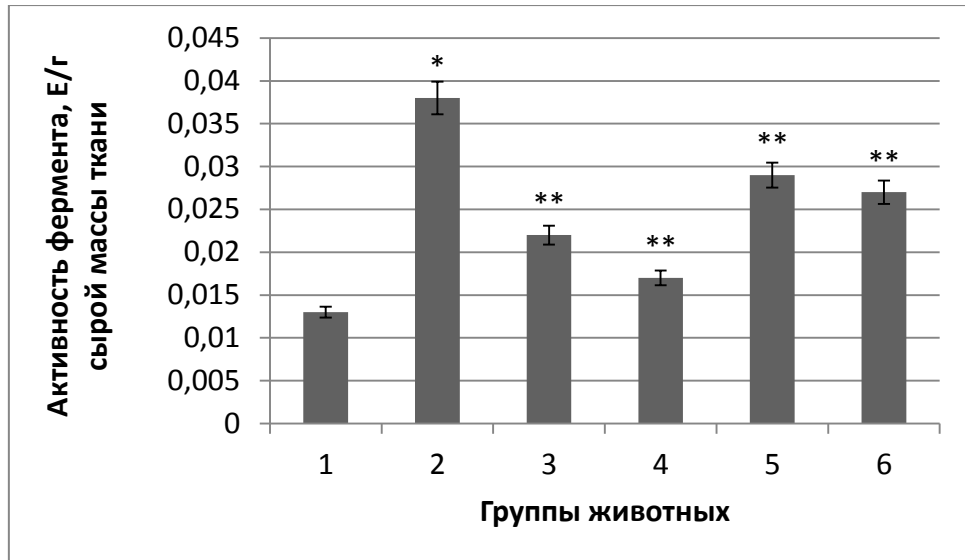


Б

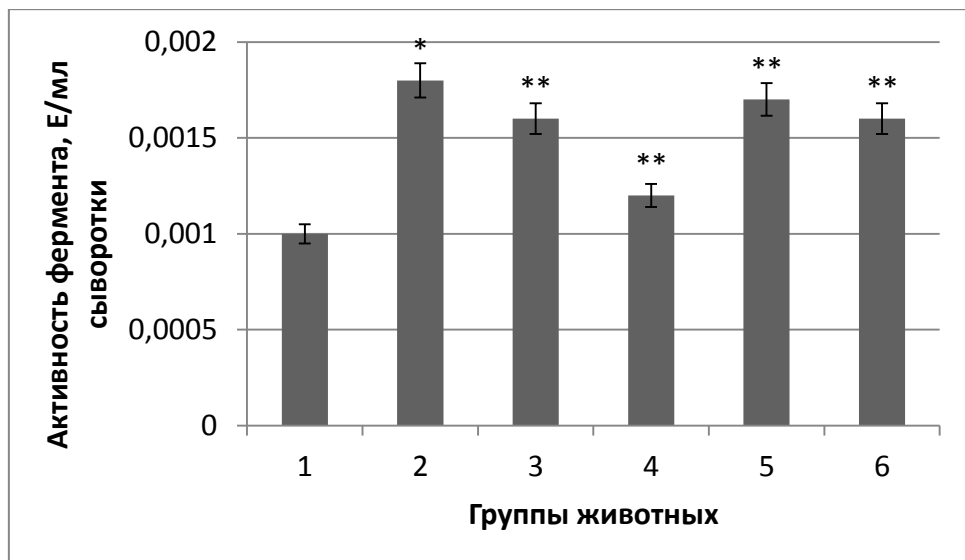


В

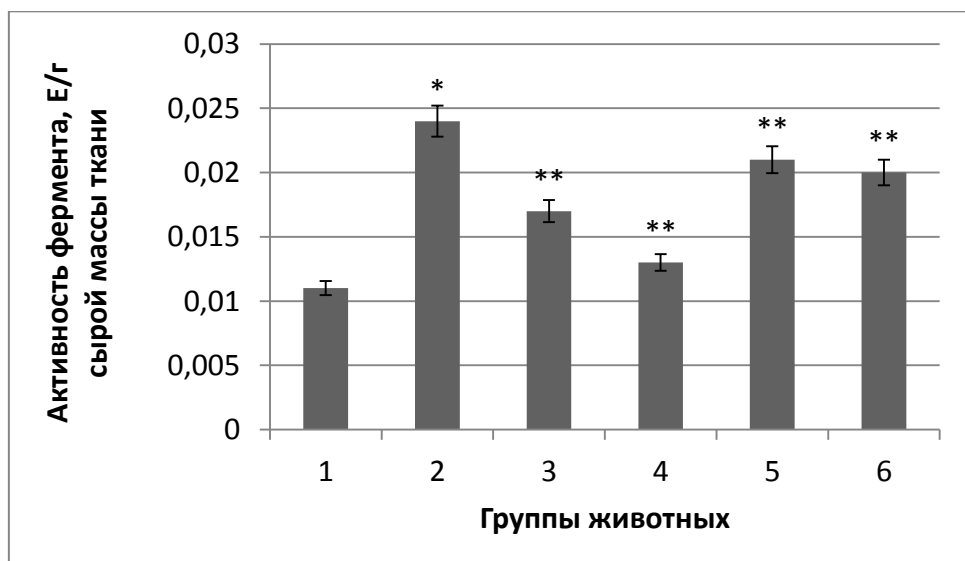
Рис. 20. А. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в виде Е/г сырой массы ткани мозга ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$. Б. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в виде Е/мл сыворотки крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$. В. Активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы в виде Е/г сырой массы ткани мозга и Е/мл сыворотки крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.



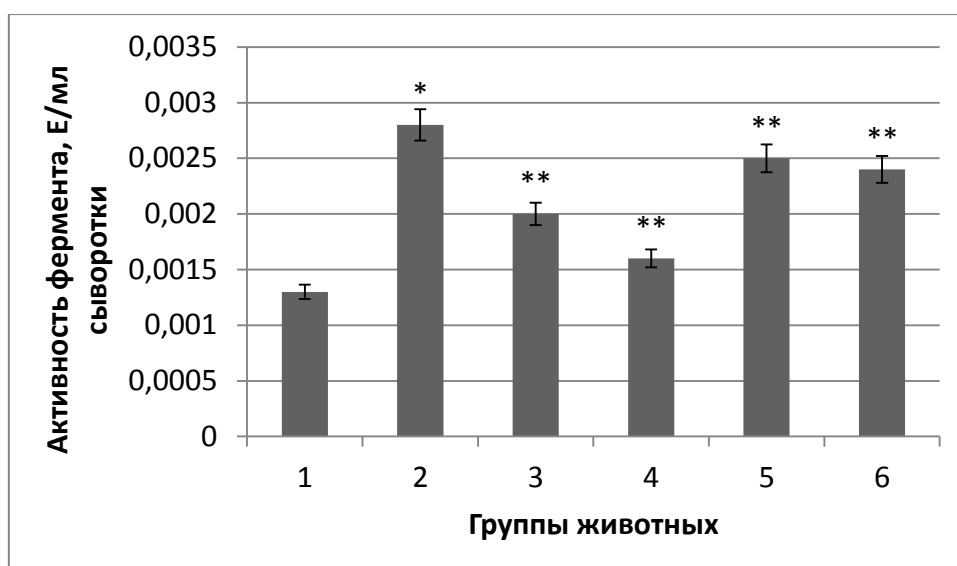
А



Б



В



Г

Рис. 21. А. Удельная активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$. Б. Удельная активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в сыворотке крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$. В. Удельная активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы в мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$. Г. Удельная активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы в сыворотке крови

ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

5.4. Транскрипционная регуляция функционирования компонентов антиоксидантной системы в условиях развития ишемии/реперфузии головного мозга у крыс и введения мелатонин-корректирующих препаратов

В регуляции функционирования АОС важное место отводят транскрипционному фактору Nrf2, который координирует экспрессию ARE (antioxidant response element)-содержащих генов, включая СОД, ГП, НАДФН-хиноноксидоредуктазу, гем-оксигеназу-1 и многих ферментов, участвующих в продуцировании глутатиона, которые могут быстро реагировать на окислительный стресс и поддерживать окислительно-восстановительный баланс в клетках [153]. Существенную роль во многих физиологических процессах в норме и при патологии играют также редокс-чувствительные транскрипционные факторы FOXO, контролирующие пролиферацию и выживаемость клеток, прогрессирование клеточного цикла, восстановление ДНК, резистентность к окислительному стрессу, энергетический метаболизм и дифференцировку клеток [129].

В ходе проведенных исследований было показано, что развитие ИРГМ сопровождалось возрастанием в мозге крыс уровней транскриптов генов *NRF2* и *FOXO1* в 3,4 и 2,6 раза относительно контроля. Введение мелаксена в дозе 10 мг/кг приводило к уменьшению данных показателей на 14 и 19%, а использование эпифамина в дозе 2,5 мг/кг – на 12 и 10%, относительно значений животных второй группы (рис. 22).

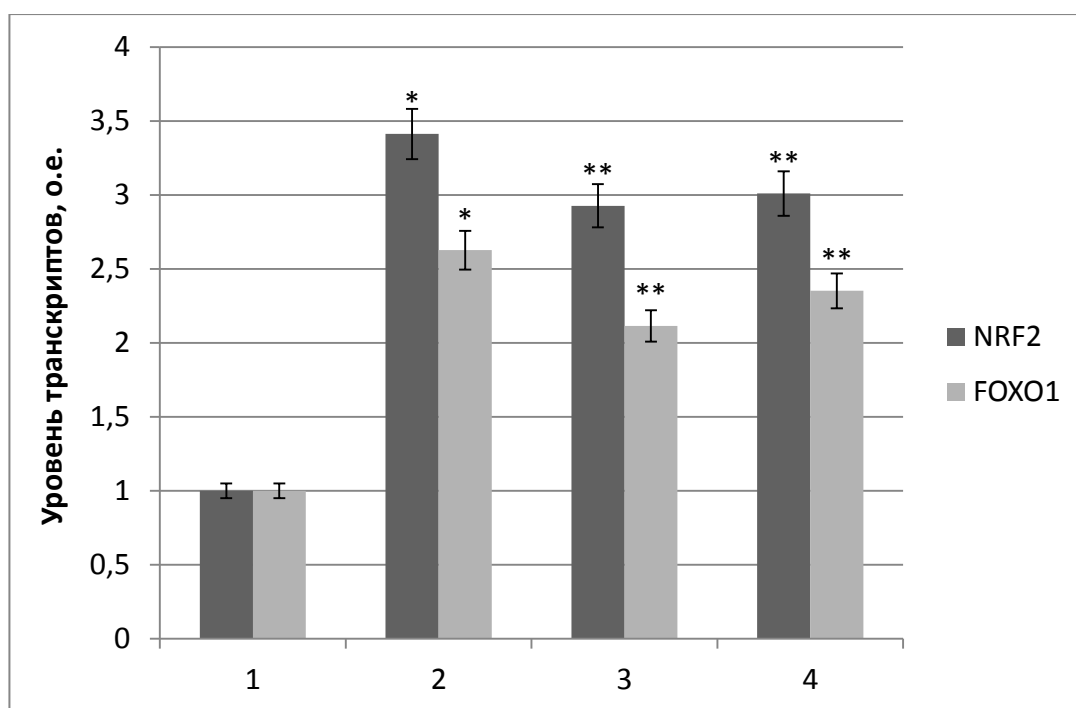


Рис. 22. Уровень транскриптов генов *NRF2* и *FOXO1* в мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 10 мг/кг (3), и эпифамина в дозе 2,5 мг/кг (4). Примечание: * - отличия от контрольной группы достоверны; ** - отличия от второй экспериментальной группы достоверны; $p < 0,05$.

Как показали результаты работы, одним из механизмов усиления антиоксидантного ответа у животных была индукция экспрессии защитных ферментов. Согласно данным литературы, среди механизмов развития таких реакций могут быть следующие. Так, известно, что при окислительном стрессе редокс-чувствительный фактор Nrf2 оставляет свой отрицательный регулятор – белок Keap1, и транслоцируется в ядро, где он взаимодействует с ARE, цис-действующим регуляторным элементом в промоторной области генов, кодирующих ферменты детоксикации и антиоксидантные белки. Впоследствии NRF2 модулирует цитоплазматический ответ на окислительный стресс [204] через транскрипционную активацию защитных генов. Необходимо отметить, что при этом сам транскрипционный фактор способен увеличивать экспрессию собственного гена, поскольку ген *NRF2* содержит перед сайтом начала транскрипции две ARE-подобные

последовательности, а ниже от сайта начала транскрипции – участок связывания NF-kB, что позволяет индуцировать его воспалительными стимулами [200]. Действительно, у животных второй экспериментальной группы наблюдалось существенное увеличение уровня транскриптов гена *NRF2*. Среди других механизмов усиления экспрессии гена *NRF2* следует отметить его индуцирование воспалительными стимулами, что связано с наличием участка связывания NF-kB ниже от сайта начала транскрипции. В ходе работы наблюдалось также возрастание уровня транскриптов гена редокс-чувствительного фактора *FOXO1*, с промотором которых способен связываться белок FOXO1, вызывая собственную экспрессию [118]. Известно, что FOXO1 контролирует прогрессирование клеточного цикла путем регулирования генов-мишеней p27Kip1 и p21. Воздействуя на гены Fas-лиганда и Vim, данный фактор регулирует также апоптоз, а с помощью транскрипционной регуляции Mn-SOD и GP защищает клетки от окислительного стресса. Кроме того, FOXO1 защищает клетки от стресса посредством регуляции гена, индуцируемого повреждением ДНК [129]. В группах животных, для которых было характерно возрастание в организме уровня мелатонина и связанное с этим увеличение концентрации мелатонинсульфата в моче в 1,5 и 1,4 раза при введении мелаксена и эпифамина на фоне ИРГМ, наблюдалась нормализация работы антиоксидантной системы и уменьшение уровня транскриптов генов *NRF2* и *FOXO1*. Причиной происходящих изменений могла выступать мощная антиоксидантная активность мелатонина, приводящая к торможению СО, снижению оксидативной нагрузки на клетки и, как следствие, уменьшению степени мобилизации защитных систем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе работы данные позволяют сделать вывод о том, что внутрибрюшинное введение мелаксена и эпифамина белым лабораторным крысам с ИРГМ оказывало нейропротекторный и антиокислительный эффект, а также регуляторное воздействие на формирование адаптивного ответа при индукции патологии, что могло быть сопряжено с проявлением биологической активности мелатонином, уровень которого корректировался исследуемыми препаратами.

Как показали проведенные исследования, введение мелаксена и эпифамина на фоне развития ИРГМ способствовало нормализации в головном мозге животных концентрации лактата, возросшей при развитии патологии. По-видимому, торможению активизации анаэробного гликолиза способствовало снижение степени повреждения и энергодефицита нейронов [11]. Данные изменения могли иметь место в условиях проявления нейропротекторной активности мелатонином [218], уровень которого корректировался тестируемыми препаратами, о чем свидетельствовало увеличение в 1,3 и 1,4 раза концентрации мелатонинсульфата в моче крыс, получавших на фоне ИРГМ инъекции эпифамина в дозах 1,25 и 2,5 мг/кг, и возрастание содержания данного метаболита в 1,4 и 1,5 раза в моче животных, которым на фоне патологии вводили мелаксен в дозах 5 и 10 мг/кг. Вместе с тем, применение исследуемых препаратов приводило к уменьшению скорости СО, что выражалось в снижении показателей биохемилюминесценции, концентрации ДК, уровня ОМБ. Кроме того, у животных, получавших на фоне развития ИРГМ инъекции мелатонин-корректирующих препаратов, наблюдалось восстановление активности АГ – чувствительной мишени действия свободных радикалов, а также уменьшение концентрации накапливающегося при индукции патологии цитрата. В настоящее время имеются литературные данные, свидетельствующие о наличии у мелатонина антиоксидантных свойств, обусловленных как его

прямыми, так и опосредованными эффектами [63]. Кроме этого, метаболиты мелатонина также могут действовать как антиоксиданты, а сам гормон не способствует протеканию окислительных реакций [124]. В дополнение ко всему, мелатонин оказывает позитивное влияние на функционирование ЭТЦ митохондрий, являющуюся одним из главных источников АФК в условиях ишемии и реперфузии.

Индукция у животных ИРГМ приводила к увеличению уровня транскриптов гена фактора NF- κ B – редокс-чувствительного положительного регулятора воспалительных процессов, играющих существенную роль в патогенезе ишемического повреждения. Помимо этого, развитие патологии было сопряжено с увеличением мРНК гена фактора HIF1 – главного регулятора гомеостаза кислорода, контролирующего активность генов, участвующих в ангиогенезе и восстановлении тканей, а также являющегося индуктором переключения клеток с окислительного на гликолитический метаболизм. Введение на фоне развития патологии мелатонин-корректирующих препаратов способствовало уменьшению уровня транскриптов генов факторов NF- κ B и HIF1, что могло быть связано с рядом эффектов мелатонина. Во-первых, достаточно мощная антиокислительная активность гормона могла обеспечивать снижение выраженности окислительного стресса и, как следствие, уменьшать степень индукции редокс-чувствительного фактора NF- κ B. Кроме того, известны противовоспалительные свойства мелатонина, заключающиеся, в частности, в предотвращении деградации I κ B α – ингибитора NF- κ B, и блокировании транслокации его субъединиц в ядро [208]. Мелатонин также способен в условиях гипоксии снижать активность индуцируемого фактора HIF-1 [247], что наряду с торможением СО и позитивным влиянием на функционирование компонентов ЭТЦ способствовало сдвигу от гликолитического метаболизма к окислительному.

Результаты исследования показали, что развитие у крыс ИРГМ сопровождалось активизацией апоптотических процессов, выразившейся в

увеличении степени фрагментации ДНК в головном мозге животных, а также активности каспазы-3 и каспазы-8. Действительно, из литературных данных известно, что в ишемических клетках наблюдается стимуляция протеинов Bcl2 с последующим высвобождением проапоптотических белков [246]. Вместе с тем, одной только ишемии для активации белков Bcl2 может быть не достаточно, так как многие члены данного семейства чувствительны к окислительному воздействию. Таким образом, существенный вклад в активизацию апоптоза могла вносить интенсификация СО на фоне постишемической реперфузии. В свою очередь, введение мелаксена – синтетического аналога мелатонина, способствовало уменьшению выраженности фрагментации ДНК и активности каспаз. Известно, что для мелатонина характерно наличие антиапоптотического эффекта, опосредуемого, с одной стороны, его способностью предотвращать индуцированный окислительным стрессом апоптоз в неопухолевых клетках [260], а с другой стороны – торможением потери потенциала митохондриальной мембраны, активации каспазы-3 и каспазы-1 и апоптотических стимулов цитокина ИЛ-1 β [218]. Помимо этого, было показано, что мелатонин усиливает экспрессию SIRT1 – сиртуина, который способствует выживанию путем ингибирования апоптоза или клеточного старения в клетках млекопитающих [117].

В ходе работы было показано, что введение мелаксена и эпифамина приводило к уменьшению активности антиоксидантных ферментов – СОД, каталазы, ГП, ГР и ГТ, мобилизация которых носила компенсаторный характер в условиях развития ИРГМ. Вместе с тем, наблюдалось изменение в направлении контрольных значений уровней мРНК генов *SOD1*, *CAT*, *GPX1* и *GSR*. Схожая динамика была характерна также для концентрации в тканях крыс GSH и активности ферментов – поставщиков НАДФН для глутатионовой АОС. Судя по всему, мелатонин, коррекция уровня которого осуществлялась тестируемыми препаратами, способствовал снижению нагрузки на компоненты антиоксидантной системы и степень их

мобилизации. Данный эффект мог быть реализован вследствие наличия у гормона как прямой способности нейтрализовывать свободные радикалы, так и опосредованной антиокислительной активности. Наряду с активизацией антиоксидантных ферментов, развитие ИРГМ было сопряжено с возрастанием уровней транскриптов генов факторов NRF2 и FOXO1. NRF2 играет важную роль в регуляции функционирования АОС, координируя экспрессию ARE-содержащих генов, включая СОД, ГП и многих ферментов, участвующих в продуцировании глутатиона [153]. Редокс-чувствительные факторы FOXO также играют важную роль в пролиферации и выживаемости клеток, прогрессировании клеточного цикла, восстановлении ДНК, резистентности к окислительному стрессу, энергетическом метаболизме и дифференцировке клеток [129]. Введение мелатонин-корректирующих препаратов способствовало, в свою очередь, к сдвигу в направлении контрольных показателей уровня транскриптов генов факторов NRF2 и FOXO1. Подобные изменения могли являться следствием уменьшения мобилизации защитных систем клеток вследствие проявления антиоксидантного эффекта мелатонином, уровень которого корректировался исследуемыми препаратами, что было сопряжено с увеличением на фоне введения мелаксена и эпифамина концентрации мелатонинсульфата в моче крыс в 1,5 и 1,4 раза соответственно, относительно значений крыс с ИРГМ.

Как показали результаты работы, более существенное позитивное влияние на исследуемые показатели оказывал мелаксен, содержащий синтетический мелатонин, который, по-видимому, быстрее включался в метаболические процессы и проявлял антиоксидантный и протекторный эффекты. Несколько менее эффективное действие эпифамина, в свою очередь, могло быть обусловлено опосредованным влиянием данного препарата на метаболизм мелатонина через эпиталамо-эпифизарную область мозга.

По результатам исследований была составлена гипотетическая схема, отражающая регуляторное воздействие мелатонин-корректирующих

препаратов на свободнорадикальный гомеостаз и нейровоспалительные процессы в условиях развития ИРГМ (рис. 23).

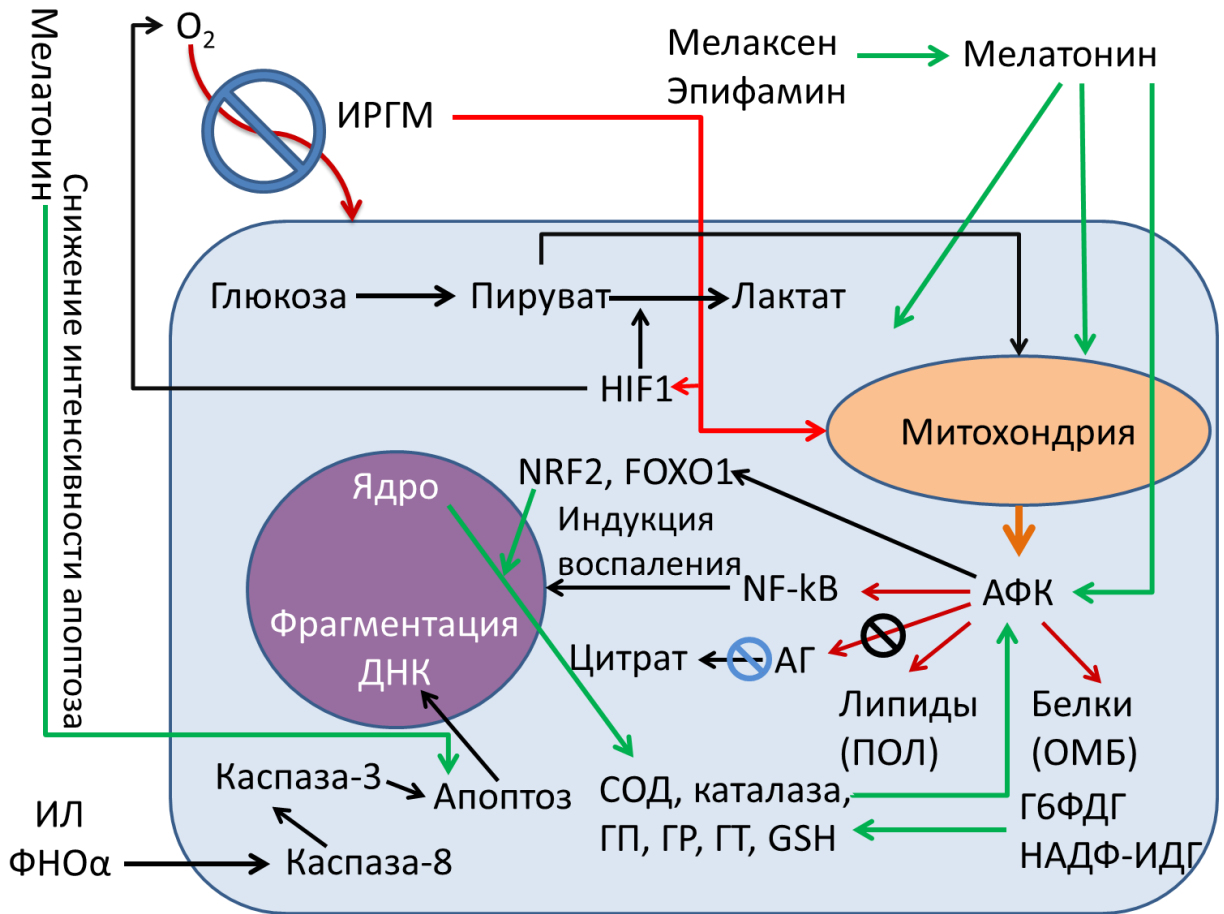


Рис. 23. Гипотетическая модель регуляции свободнорадикального гомеостаза, интенсивности апоптотических процессов и функционирования транскрипционных факторов, участвующих в реализации адаптивного ответа, воздействием мелатонин-корректирующих препаратов при ишемии/реперфузии головного мозга.

Так, модуляция ИРГМ у крыс путем 30-минутной окклюзии общих сонных артерий способствовала активизации анаэробного окисления глюкозы, что приводило к накоплению лактата в мозге животных. Индукция ишемии с последующей реперфузией приводила к чрезмерной генерации АФК, главным источником которых выступали митохондрии. Под воздействием свободных радикалов происходила интенсификация процессов СО, в частности ПОЛ и ОМБ. Помимо этого, наблюдалось угнетение активности АГ, активный центр которой чувствителен к действию АФК, и

накопление субстрата данного фермента – цитрата. В условиях развития патологии было выявлено увеличение уровня транскриптов гена кислородочувствительного фактора HIF1 – главного регулятора клеточного ответа на гипоксию, и редокс-чувствительного фактора NF- κ B, отвечающего за индукцию воспалительного процесса. Индукция ИРГМ, приводящая к индукции воспаления, а также нарушению целостности митохондриальной мембраны в условиях окислительного стресса, способствовала активизации апоптотических процессов, что отражалось в возрастании активности каспазы-3, каспазы-8 и степени фрагментации ДНК. Компенсаторным адаптивным ответом на окислительный стресс при ИРГМ было увеличение активности компонентов антиокислительной защиты, поставщиков НАДФН для глутатионовой АОС, а также уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов. Увеличивался также уровень мРНК генов факторов NRF2 и FOXO1 – регуляторов клеточного ответа на окислительный стресс. Введение мелаксена и эпифамина, по-видимому, обеспечивало поддержание на необходимом уровне содержания мелатонина, эффекты которого обуславливали наблюдаемые изменения. Таким образом, выявленная в условиях ИРГМ нейропротекторная и антиокислительная активность мелатонин-корректирующих препаратов была сопряжена с выраженным прямым и опосредованным антиоксидантным действием мелатонина, выразившимся в изменении в направлении контрольных значений параметров биохемилюминесценции, содержания диеновых конъюгатов, а также уровня окислительной модификации белков в мозге и сыворотке крови крыс с индуцированной патологией. Существенный вклад в нормализацию анализируемых параметров могло также вносить позитивное влияние мелатонина на функционирование ЭТЦ митохондрий, регуляцию протекания апоптотических и воспалительных процессов. Судя по всему, указанные биологические эффекты гормона в условиях развития патологии обеспечивали уменьшение степени окислительного стресса, нагрузки на

защитные системы организма животных и, как следствие, снижение выраженности компенсаторного адаптивного ответа.

ВЫВОДЫ

1. Коррекция уровня мелатонина при внутрибрюшинном введении мелаксена (дозы 5 и 10 мг/кг) и эпифамина (дозы 1,25 и 2,5 мг/кг) на фоне развития ИРГМ у крыс приводила к нормализации концентрации лактата и снижению уровней транскриптов генов нейровоспалительных факторов - $\text{NF-}\kappa\text{B}$ и $\text{NF-}\kappa\text{B}$, возраставших в мозге животных при патологии в 3,7 и 1,7 раза.

2. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов крысам с ИРГМ приводило к торможению интенсивности протекания свободнорадикальных процессов, что подтверждалось уменьшением показателей биохемилюминесценции, содержания диеновых конъюгатов и уровня окислительной модификации белков.

3. Внутрибрюшинное введение мелаксена в дозе 10 мг/кг на фоне развития патологии способствовало уменьшению активности протекания апоптотических процессов в мозге белых лабораторных крыс, что сопровождалось снижением активности каспазы-3 и каспазы-8 на 32 и 37%, а также уменьшением степени фрагментации ДНК.

4. При внутрибрюшинном введении мелаксена и эпифамина происходило снижение уровня транскриптов генов супероксиддисмутазы (*SOD1*) и каталазы (*CAT*) относительно показателей при патологии в 1,2 и 1,5 раза, а также активности данных ферментов, возраставшей в условиях развития ИРГМ у крыс.

5. Применение мелаксена и эпифамина на фоне индукции патологии у крыс способствовало изменению в направлении контрольных показателей активности глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы и содержания восстановленного глутатиона.

6. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов при ИРГМ было сопряжено с нормализацией экспрессии генов глутатионпероксидазы (*GPX1*) и глутатионредуктазы (*GSR*), о чем свидетельствовало снижение

уровня транскриптов генов исследуемых ферментов по сравнению с патологическим состоянием.

7. Уровень мРНК генов транскрипционных факторов, участвующих в регуляции функционирования антиоксидантной системы и выживаемости клеток – NRF2 и FOXO1, возрастал в мозге крыс в условиях индукции ИРГМ в 3,4 и 2,6 раза. При введении мелаксена и эпифамина на фоне развития патологии содержание транскриптов генов данных факторов снижалось, приближаясь к показателям в норме.

8. Введение тестируемых препаратов крысам с ИРГМ приводило к сдвигу активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы в направлении контрольных значений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арушанян Э.Б. Эпифизарный гормон мелатонин и нарушения познавательной деятельности головного мозга / Э.Б. Арушанян // РМЖ. – 2006. – Т. 14, № 9. – С. 63
2. 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
3. Болдырев А.А. Дискриминация между апоптозом и некрозом нейронов под влиянием окислительного стресса / А.А. Болдырев // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 7. – С. 834–842
4. 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.
5. Васильев В.Б. Дисмутирование супероксидных радикалов церулоплазмином — детали механизма / В.Б. Васильев, А.М. Качурин, Н.В. Сорока // Биохимия. — 1988. — Т. 53, № 12. — С. 2051–2058
6. Влияние гуанидиновых производных на активность супероксиддисмутазы и каталазы при постишемической реперфузии головного мозга у крыс / А.В. Макеева [и др.] // Нейрохимия. – 2010. – Т. 27, № 3. – С. 245-250
7. Влияние мелатонина на оксидативный статус, содержание цитрата и активность аконитатгидратазы в печени крыс при токсическом гепатите/ А.Н. Пашков [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2005. – Т.51, №6. – С.41-43
8. Влияние некоторых бигуанидов на оксидативный статус тканей крыс при ишемии/реперфузии головного мозга / О.А. Сафонова [и др.] // Нейрохимия. – 2009. – Т. 26, № 4. – С. 328–332

9. Гмиро В.Е. Сравнительный анализ NMDA-блокирующей активности и безопасности моно-катионных и бис-катионных соединений в опытах на животных / Гмиро В. Е., Сердюк С. Е. // Эксп. клин, фармакол. – 2000. – № 3. – С. 16-20
10. Гомазков О.А. Нейрохимия ишемических и возрастных патологий мозга / О.А. Гомазков. – М.: ИАИ, 2003. – 200 с.
11. Гусев Е.И. Ишемия головного мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова – М.: Медицина, 2001. – 328 с.
12. Гусев Е.И. Проблема инсульта в России / Е.И. Гусев // Инсульт (Приложение к “Журналу неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова”). – 2003. – № 9. – С. 3–5
13. Дубинина Е.Е. Антиоксидантная система плазмы крови / Е.Е. Дубинина // Укр. Биохим. Журн. – 1992. – Т. 64, № 2. – С. 3 – 15
14. Интенсивность свободнорадикального окисления и каталитические свойства NADP-изоцитратдегидрогеназы в печени крыс в норме и при токсическом гепатите / Е.М. Андреещева [и др.] // Биомедицинская химия. – 2006. – Т. 52, Вып. 2. – С.153-160
15. Иржак Л.И. Дыхательная функция крови в условиях гипероксии / Л.И. Иржак, В.В. Гладилов, Н.А. Мойсеенко. – М.: Медицина, 1985. – 176 с.
16. Калаева Е.А. Теоретические основы и практическое применение математической статистики в биологических исследованиях и образовании / Е.А. Калаева, В.Г. Артюхов, В.Н. Калаев. – Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2016. – 283 с.
17. Калинина Т.С. Уровень мРНК фермента апоптоза-каспазы-3 в стволе и коре головного мозга крыс в постнатальном онтогенезе / Т.С. Калинина, А.В. Баннова, Н.Н. Дыгало // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 134, № 12. – С. 641–644
18. Кинетические свойства глутатионредуктазы из печени крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите / А.А. Агарков [и др.] //

- Вестник ВГУ, серия: химия, биология, фармация. – 2007. – №2. – С. 59-63
19. Кишкун А.А. Доказательная лабораторная медицина / А.А. Кишкун, С.Л. Арсенин, О.Л. Кольченко // Клин. Лаб. Диагност. – 2005. – Т. 5. – С. 24—32
20. Коррекция последствий постишемического реперфузионного повреждения головного мозга цитофлавином / В.В. Бульон [и др.] // Бюл. exper. биол. и мед. – 2000. – Т. 129, № 2. – С. 149- 151
21. 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.
22. Левенкова М.В. Особенности регуляции активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы из печени крыс некоторыми углеводами и ди- и трикарбоновыми кислотами при токсическом гепатите / М.В. Левенкова, Т.Н. Попова, А.В. Семенихина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2006. – №2. – С. 34-36
23. Литвицкий П.Ф. Адаптивные и патогенные эффекты реперфузии и реоксигенации миокарда / П.Ф. Литвицкий, В.А. Сандриков, Е.А. Демуров. – М.: Медицина, 1994. – 319 с.
24. Ллойд Э. Справочник по прикладной статистике / Э. Ллойд, У. Ледерман. – М.: Финансы и статистика, 1990. – 525 с.
25. Лукьянова Л.Д. Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы, коррекция / Л.Д. Лукьянова // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1997. – Т. 124, № 9. – С. 244 -254
26. Лукьянова Л.Д. Дизрегуляция аэробного энергетического обмена – типовой патологический процесс / Л.Д. Лукьянова // В кн.: Дизрегуляционная патология. – М.: Медицина, 2002. – С. 188–215
27. Лукьянова, Л.Д. Современные проблемы гипоксии. / Л.Д. Лукьянова // Вестник РАМН. – 2000. – № 9. – С. 3-12

- 28.Макеева А.В. Воздействие тиоктовой кислоты на функционирование глутатионового редокс-цикла при развитии ишемии-реперфузии головного мозга у крыс / А. В. Макеева, Т. Н. Попова // Нейрохимия – 2009. – Т. 26, № 2. – С. 130-137
- 29.Максимович Н.Е. Роль оксида азота в патогенезе ишемических и реперфузионных повреждений мозга / Н.Е. Максимович. – Гродно: ГрГМУ, 2004. – 180 с.
- 30.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
- 31.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
- 32.Меньшикова В.В. Справочник Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
- 33.Миронова Г.Д. Использование модуляторов ионных каналов как возможный путь лечения сердечно-сосудистых заболеваний, окислительного стресса и нейродегенеративных нарушений / Г.Д. Миронова // Патогенез. – 2011. - Т. 9, №3. - С. 47
- 34.Мирошниченко О.С. Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы / О.С. Мирошниченко // Биополимеры и клетка. – 1992. – Т 8, № 6. – С. 3–9
- 35.Митохондриальные антиоксиданты тиоредоксин 2 и Mn супероксиддисмутаза вовлекаются в механизмы гипоксической толерантности мозга / М.О. Самойлов, Е.А. Рыбникова, Е.И. Тюлькова и др. // Докл. АН. – 2002. – Т. 387, № 3. – С. 414–417
- 36.Новиков В.Е. Аминотиоловые антигипоксанты при травматическом отеке головного мозга / В.Е. Новиков, Н.С. Понамарева, П. Д. Шабанов. – СПб.: Элби-СПб, 2008. – 176 с.

- 37.Новиков В.Е. Влияние метапрота и гипоксена на развитие воспалительной реакции в эксперименте / В.Е. Новиков, С.А. Илюхин, Е.В. Пожилова // Обзоры по клин. фармакологии и лек. терапии. - 2005. - Т.4, №1. - С. 2-20
- 38.Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е.Е. Дубинина [и др.] // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24 – 26
- 39.Пожилова Е.В. Регуляторная роль митохондриальной поры и возможности её фармакологической модуляции / Е.В. Пожилова, В.Е. Новиков, О.С. Левченкова // Обзоры по клин. фармакологии и лек. терапии. - 2014. - Т.12, №3. - С. 13-19
- 40.Раевский К.С. Оксид азота — новый' физиологический мессенджер: возможная роль при патологии центральной нервной системы / К.С. Раевский // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 1997. – Т. 123, № 5. – С. 484–490
- 41.Роль свободнорадикальных и метаболических процессов в патогенезе сахарного диабета I типа: монография / А.А. Савченко, Н.М. Титова, Т.Н. Субботина [и др.]. – Красноярск: Сиб. Фед. Ун-т, 2012. – 269 с.
- 42.Сафонова О.А. Активность некоторых надфн-генерирующих ферментов в тканях крыс при введении производных янтарной кислоты и хитозана в различных дозах на фоне развития ишемии/ реперфузии головного мозга / А.О. Сафонова, Т.Н. Попова, А.И. Сливкин // Вестник ВГУ, серия: химия. Биология. Фармация. – 2015. - № 3. – С. 89-93
- 43.Соловьева Д.В. Применение тималина и эпиталамина для коррекции в возрастных нарушений гомеостаза у женщин / Д.В. Соловьева, В.Х. Хавинсон // Клинич. геронтология. – 2000. – Т. 6, № 7-8.– С. 106
- 44.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
- 45.Ткачук В.А. Клиническая биохимия / В.А. Ткачук. – М.: Медицина, 2004. – 515 с.
- 46.Турков М.И. Супероксиддисмутаза: свойства и функции / М.И. Турков // Успехи современной биологии. – 1976. – Т. 81. – Вып. 3. – С. 341-355
- 47.Федорова Т.Н. Перекисное окисление липидов мозга при экспериментальной ишемии мозга / Т.Н. Федорова, А.А. Болдырев, И.В. Ганнушкина // Биохимия. – 1999. – Т. 64, № 1. – С. 94–98
- 48.Фридович И.В. Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода / И.В. Фридович // Свободные радикалы в биологии / Под ред. У. Прайора. М.: Мир, 1979. – Т. 1. – С. 272-314
- 49.Чуканова Е.И. Хроническая ишемия мозга, нейропластичность, возможности терапии / Е.И. Чуканова, А.С. Чуканова // Неврология,нейропсихиатрия,психосоматика — 2017. — № 2. – С. 102-107
- 50.Шульгин К.К. Получение и свойства глутатионпероксидазы / К.К. Шульгин, Т.Н. Попова, Т.И. Рахманова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. –Т.44, №3. – С. 276-280
- 51.Эффективность препарата «Мексидол» при экспериментальной ишемии головного мозга / Н.И. Нечипуренко [и др.] // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2006. – Приложение 1. – С. 224-229
- 52.A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P / G. Takebe [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277. – P. 41254–41258
- 53.A systematic, integrated study on the neuroprotective effects of hydroxysafflor yellow a revealed by 1H NMR-based metabonomics and the NF-κB pathway / Y. Liu [et al.] // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2013. – V. 2013: 147362

54. Accumulation of lipophilic dications by mitochondria and cells / M.F. Ross [et al.] // *Biochem. J.* - 2006. - Vol. 400. - P. 199-208
55. Akerboom, T. P. M. The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver / T. P. M. Akerboom, M. Bilzer, H. Sies // *J. Biol. Chem.* - 1982. - V. 257. - P. 4248-4256
56. Alcain F.J. Ceruloplasmin stimulates thymidine incorporation by CCL— 39 cells in the absence of serum of growth factors / F.J. Alcain, H. Low, F.L. Crane // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1991. - Vol. 180, N 2. - P. 790–796
57. Amiloride is neuroprotective in an MPTP model of Parkinson's disease / R.L. Arias [et al.] // *Neurobiol Dis.* - 2008. - V. 31, N 3. - P. 334–341
58. Aminoguanidine Ameliorates and l-Arginine Worsens Brain Damage From Intraluminal Middle Cerebral Artery Occlusion / F. Zhang [et al.] // *Stroke.* - 1996. - Vol. 27. - P. 317–323
59. An evaluation of the neuroprotective effects of melatonin in an in vitro experimental model of age-induced neuronal apoptosis / M. Tajés Orduña [et al.] // *J Pineal Res.* - 2009. - V. 46, N 3. - P. 262-267
60. Anisimov V.N. Effects of exogenous melatonin – a review / V.N. Anisimov // *Toxicol. Pathol.* - 2003. - V. 31, № 6. - P. 589–603
61. 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
62. 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
63. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of

- organ dysfunction in a rat model of acute sepsis / D.A. Lowes [et al.] // *Br J Anaesth.* – 2013. – V. 110, N 3. – P. 472-480
64. Arendt J. Melatonin and human rhythms / J. Arendt // *Chronobiol Int.* – 2006. – V. 23, № 1-2. – P. 21–37
65. 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
66. ASICs mediate the modulatory effect by paeoniflorin on alpha-synuclein autophagic degradation / X. Sun [et al.] // *Brain Res.* – 2011. – V. 1396. – P. 77–87
67. Atmaca G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids / G. Atmaca // *Yonsei. Med. J.* – 2004. – V. 45, № 5. – P. 776-788
68. Atorvastatin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through anti-inflammatory and antioxidant effects / Q. Tu [et al.] // *Neural Regen Res.* – 2014. – V. 9, N 3. – P. 268-275
69. Bannister J.V. Does caeruloplasmin dismutase superoxide? No / J.V. Bannister, W.H. Bannister, H.A.O. Hill // *FEBS Lett.* — 1980. — Vol. 118, N 1. — P. 127–129
70. Barakat R. Differential cytokine expression by brain microglia/macrophages in primary culture after oxygen glucose deprivation and their protective effects on astrocytes during anoxia / R. Barakat, Z. Redzic // *Fluids and Barriers of the CNS.* – 2015. – V. 12. – article 6
71. Barnes G. Ceruloplasmin receptors of erythrocytes / G. Barnes, E. Frieden // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1984. — Vol. 125, N 1. — P. 157–162
72. Beal M.F. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? / M.F. Beal, B.T. Hyman, W. Koroshetz // *Trends Neurosci.* – V. 1993. – V. 16. – P. 125–131
73. Becker B.F. Towards the physiological function of uric acid / B.F. Becker // *Free Radic Biol Med.* – 1993. – V. 14, №6. – P. 615-631

74. Behmanesh S. Mechanisms of endothelial cell swelling from lactacidosis studied in vitro / S. Behmanesh, O. Kempinski // *Amer. J. Physiol.* – 2000. – Vol. 279, N 4. – P. 1512–1517
75. 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
76. Bharatkumar N. A novel glycosylphosphatidylinositol — anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes / N. Bharatkumar, B.N. Patel, S. David // *J. Biol. Chem.* — 1997. — Vol. 272, N 32. — P. 20185–20190
77. 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
78. Bo K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia Part I: Pathophysiology / K. Bo, B.K. Siesjo // *J. Neurosurg.* – 1992. – Vol. 77, N 2. – P. 169–184
79. 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
80. Brigelius-Flohe R. Glutathione peroxidases / R. Brigelius-Flohe, M. Maiorino // *Biochim. Biophys. Acta* – 2013. – V. 1830. – P. 3289–3303
81. Cai Z. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health / Z. Cai, L.J. Yan // *Journal of Biochemical and Pharmacological Research.* – 2013. – V. 1. – P. 15–26
82. Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity / A. Mesquita [et al.] // *PNAS.* – 2010. – V. 107, № 34. – P. 15123–15128
83. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship / M. Macias [et al.] // *Euro. J. Biochem.* – 2003. – V. 270. – P. 832–840

84. Camacho A. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death / A. Camacho, L. Massieu // *Arch. Med. Res.* – 2006. – Vol. 37. – P. 11–18
85. Cellular expression of ceruloplasmin in baboon and mouse lung during development and inflammation / E. Yang [et al.] // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* — 1996. — Vol. 14, N 2. — P. 161–169
86. Ceruloplasmin gene expression in the murine central nervous system / L.W. Klomp [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 1996. — Vol. 98, N 1. — P. 207–215
87. Changes of neural activity correlate with the severity of cortical ischemia in patients with unilateral major cerebral artery occlusion / M. Bundo [et al.] // *Stroke.* – 2002. – Vol. 33, N 1. – P. 61–66
88. 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
89. 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
90. Common structural features of MAPEG – a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism / P.J. Jakobsson [et al.] // *Protein Science.* – 1999. – V. 8. – P. 689–692
91. Comparison of isocitrate dehydrogenase from three hyperthermophiles reveals differences in thermostability, cofactor specificity, oligomeric state, and phylogenetic affiliation / I.H. Steen [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 43924–43931
92. Congenital 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) deficiency associated with chronic hemolytic anemia in a Spanish family / J.L. Vives Corrons [et al.] // *Am. J. Hemotol.* – 1996. – V. 53. – P. 221–227

93. Connor J.R. Iron regulation in the brain: histochemical, biochemical and molecular considerations / J.R. Connor, A. Bencovic // *Ann. Neurol.* — 1992. — Vol. 32, Suppl. — S. 51–61
94. Contreras-Shannon V. Influence of compartmental localization on the function of yeast NADP-specific isocitrate dehydrogenase / V. Contreras-Shannon, L. McAlister-Henn // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2004. — V. 423. — P. 235–246
95. 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
96. Control of oxidative posttranslational cysteine modifications: from intricate chemistry to widespread biological and medical applications / C. Jacob [et al.] // *Chemical Research in Toxicology.* — 2012. — V. 25. — P. 588–604
97. Crow M.T. Hypoxia, BNip3 Proteins, and the Mitochondrial Death Pathway in Cardiomyocytes / M.T. Crow // *Circ. Res.* — 2002. — Vol. 91. — P. 183–185
98. Crystal structure of *Bacillus subtilis* isocitrate dehydrogenase at 1.55 Å. Insights into the nature of substrate specificity exhibited by *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase / S.K. Singh [et al.] // *The Journal of biological chemistry.* — 2001. — V. 276. — P. 26154-26163
99. 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
100. 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
101. Cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism / H.J. Koh [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279. — P. 39968-39974

102. 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
103. 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
104. Daily rhythm in human urinary melatonin / H.J. Lynch [et al.] // *Science*. – 1975. – V. 187. – P. 169–171
105. Dawson J.H. Coordination environment and fluoride binding of type 2 copper in the blue copper oxidase ceruloplasmin / J.H. Dawson, D.M. Dooley, H.B. Gray // *Proc. Nat. Acad. Sci.* — 1978. — Vol. 75, N 9. — P. 4078–4081
106. Delayed Reduction of Ischemic Brain Injury and Neurological Deficits in Mice Lacking the Inducible Nitric Oxide Synthase Gene / C. Iadecola [et al.] // *J. Neurosci.* – 1997. – Vol. 17. – P. 9157–9164
107. Deneke S.M. Thiol-based antioxidants / S.M. Deneke // *Curr. Top. Cell Regul.* – 2000. – V. 36. – P. 151–180
108. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes / M. Deponte // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2013. – V. 1830. – P. 3217–3266
109. Detection of multiple forms of human ceruloplasmin / M. Sato [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265, N 5. — P. 2533–2537
110. 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
111. Distinct Phenotypes of Human Prostate Cancer Cells Associate with Different Adaptation to Hypoxia and Pro-Inflammatory Gene Expression / L. Ravenna [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – V. 9, N 5. – e96250

112. Does closure of acid-sensing ion channels reduce ischemia/reperfusion injury in the rat brain? / J. Wang [et al.] // *Neural Regen Res.* – 2013. – V. 8, N 13. – P. 1169–1179
113. 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
114. Dubocovich M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals / M. Dubocovich, M. Markowska // *Endocrine.* – 2005. – V. 27, № 2. – P. 101–110
115. Effects of a Synthetic Allosteric Modifier of Hemoglobin Oxygen Affinity on Outcome From Global Cerebral Ischemia in the Rat / H.P. Grocott [et al.] // *Stroke.* – 1998. – Vol. 29, N 8. – P. 1650–1655
116. Eltzschig H.K. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation / H.K. Eltzschig, T. Eckle // *Nat Med.* – 2011. – V. 17, N11. – P. 1391-401
117. Espino J. Oxidative Stress and Immunosenescence: Therapeutic Effects of Melatonin / J. Espino, J.A. Pariente, A.B. Rodríguez // *Oxid Med Cell Longev.* – 2012. – V. 2012:67029
118. Essaghir A, Dif N, Marbehant CY, Coffier PJ, Demoulin JB. The Transcription of FOXO Genes Is Stimulated by FOXO3 and Repressed by Growth Factors / A. Essaghir [et al.] // *Journal of Biological Chemistry.* – 2009. – V. 284, N 16. – P. 10334-10342
119. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (GPx) superfamily / A. Toppo [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2008. – V. 10. – P. 1501–1514
120. 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

121. Extracellular spermine exacerbates ischemic neuronal injury through sensitization of ASIC1a channels to extracellular acidosis / B. Duan [et al.] // *J Neurosci.* – 2011. – V. 31, N 6. – P. 2101–2112
122. Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: an update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD / Z. Qin [et al.] // *Transl. Res.* – 2008. – Vol. 151, № 2. – P. 68-78
123. Famakin B. M. The immune response to acute focal cerebral ischemia and associated post-stroke immunodepression: a focused review / B.M. Famakin // *Aging and Disease.* – 2014. – V. 5, N 5. – P. 307–326
124. Fernando S. Melatonin: shedding light on infertility? - a review of the recent literature / S. Fernando, L. Rombauts // *J Ovarian Res.* – 2014. – V. 7: 98
125. Fitzpatrick A.M. Glutathione Redox Control of Asthma: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities / A.M. Fitzpatrick, D.P. Jones, L.A. Brown // *Antioxid Redox Signal.* – 2012. – V. 17, N 2. – P. 375-408
126. Flavonoid wogonin from medicinal herb is neuroprotective by inhibiting inflammatory activation of microglia / H. Lee [et al.] // *The FASEB Journal.* – 2003. – V. 17, N 13. – P. 1943–1944
127. Flow Cytometric Analysis of Inflammatory Cells in Ischemic Rat Brain / M. Campanella [et al.] // *Stroke.* – 2002. – Vol. 33, N 2. – P. 586–592
128. Forman H. J. On the stability to bovine superoxide dismutase / H. J. Forman, I. Fridovich // *The J. of Biol. Chem.* – 1973. – V. 248, № 8. – P. 2645–2649
129. FOXO1 promotes wound healing through the up-regulation of TGF- β 1 and prevention of oxidative stress / B. Ponugoti [et al.] // *J Cell Biol.* – 2013. – V. 203, N 2. – P. 327-343

130. Franco D.G. The Cellular State Determines the Effect of Melatonin on the Survival of Mixed Cerebellar Cell Culture / D.G. Franco, R.P. Markus // PLoS One. – 2014. – V. 9, N 9. – e106332
131. Freeman B.A. Biology of disease: free radicals and tissue injury / B.A. Freeman, JD. Crapo // Lab Invest. – 1982. – V. 47. – P. 412–426
132. From rapid to delayed and remote postconditioning: the evolving concept of ischemic postconditioning in brain ischemia / H. Zhao [et al.] // Curr. Drug Targets. - 2012. - № 13. - P. 173- 187
133. Fung B.K. Transducin: structure, function, and role in phototransduction / B.K. Fung // Progress in retinal research. – 1986. – V. 6. – P. 151-177
134. Fung M.L. Acute hypoxia elevates nitric oxide generation in rat carotid body in vitro / M.L. Fung, J.S. Ye, P.C. Fung // Pflugers Archiv. – 2001. – V. 442, N 6. – P. 903–909
135. Galano A. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals / A. Galano, J.R. Alvarez-Idaboy // RSC Advances. – 2011. – V. 1. – P. 1763–1771
136. 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
137. 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
138. Genetic and biochemical interactions involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes / B. Przybyla-Zawislak [et al.] // Genetics – 1999. – V. 152. – P. 153–166
139. Ghosh A. Calcium signaling in neurons, molecular mechanisms and cellular consequences / A. Ghosh, M.E. Greenberg // Science. - 1995. - V.268, N 5208. - P. 239-247

140. Giordano F.J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure / F.J. Giordano // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 500–508
141. Glutathione peroxidase 4 has a major role in protecting mitochondria from oxidative damage and maintaining oxidative phosphorylation complexes in gut epithelial cells / P. Cole-Ezea [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2012. – V. 53. – P. 488–497
142. Glutathione transferase superfamily behaves like storage proteins for dinitrosyl-diglutathionyl-iron complex in heterogeneous systems / P. Turella [et al.] // *The journal of biological chemistry.* – 2003. – V. 278, № 43. – P. 42294–42299
143. 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
144. Granger D.N. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept / D.N. Granger, P.R. Kvietys // *Redox Biol.* – 2015. – V. 6. – P. 524-551
145. Gravallesse E.M. Cellular mechanisms and the role of cytokines in bone erosions in rheumatoid arthritis / E.M. Gravallesse, S.R. Goldring // *Arthritis Rheum.* – 2000. – V. 43. – P. 2143-2151
146. Gregersen P.K. Genetics of rheumatoid arthritis: confronting complexity / P.K. Gregersen // *Arthritis Res.* – 1999. – V. 1. – P. 37-44
147. Guimaraes C.A. Programmed cell death: apoptosis and alternative deathstyles / C.A. Guimaraes, R. Linden // *Eur. J. Biochem.* – 2004. – Vol. 217. – P. 1638–1650
148. Halliwell B. Free radicals in biology and medicine. Fourth ed. / B. Halliwell, J.M. Gutteridge – New York: University Press Inc., 2007. – 851 p.
149. Harris E.D. The transport of copper / E.D. Harris // *Prog. Clin. Biol. Res.* — 1993. — Vol. 380, N 1. — P. 163–179

150. Hartz, J. W. Preparation and physicochemical properties of human erythrocyte cytochrome c / J. W. Hartz, H. F. Deutsch // *The J. of Biol. Chem.* – 1969. – V. 244, № 17. – P. 4565-4572
151. Haselbeck, R.J. Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases / R.J. Haselbeck, L. McAlister-Henn // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – P. 12116–12122
152. Hayes J.D. Glutathione transferases / J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* – 2005. – V. 45. – P. 51–88
153. Hayes J.D. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer / J.D. Hayes, M. McMahon // *Trends Biochem Sci.* – 2009. – V. 34, N 4. – P. 176-188
154. Heparin-affinity patterns and composition of extracellular superoxide dismutase in human plasma and tissues / J. Sandström [et al.] // *Biochem. J.* – 1993. – V. 294, № 3. – P. 853-857
155. Hesketh J. Nutrigenomics and selenium: Gene expression patterns, physiological targets, and genetics / J. Hesketh // *Annu. Rev. Nutr.* – 2008. – V. 28. – P. 157–177
156. Holtzman N.A. Identification of an apo-ceruloplasmin-like substance in the plasma of copper-deficient rats / N.A. Holtzman, B.M. Gaumnitz // *J. Biol. Chem.* — 1970. — Vol. 245, N 9. — P. 2350–2353
157. Hsia C.C. Respiratory function of hemoglobin / C.C. Hsia // *New Engl. J. Med.* – 1998. – N 338. – P. 239–247
158. Huang J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia /J. Huang, U.M. Upadhyay, R.J. Tamargo // *Surg. Neurol.* — 2006. — № 66. — P. 232—245
159. Huss J.D. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance / J.D. Huss, D.P. Kelly // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 547–555

160. Hypoxia Inducible Factor 1-Alpha (HIF-1 Alpha) Is Induced during Reperfusion after Renal Ischemia and Is Critical for Proximal Tubule Cell Survival / E. Conde [et al.] // PLoS One. – 2012. – V. 7, N 3. – e33258
161. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury / C. Iadecola // Trends Neurosci. – 1997. – V. 20, N 3. – P. 132-139
162. 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
163. Increased yield of high-purity and active tetrameric recombinant human ECSOD by solid phase refolding / K. Ryu [et al.] // Microbiol. Biotechnol. – 2008. – V. 18, № 10. – P. 1648-1654
164. Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1 α and STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells / S. Carbajo-Pescador [et al.] // Br J Cancer. – 2013. – V. 109, N 1. – P. 83-91
165. Ischemia/Reperfusion / T. Kalogeris [et al.] // Compr Physiol. – 2016. – V. 7, N 1. – P. 113–170
166. Weisiger R. A. Superoxide dismutase / R. A. Weisiger, I. Fridovich // The J. Of Biol.Chem. – 1973. – V. 248, № 10. – P. 3582-3592
167. Isolation and partial characterization of molecular forms of ceruloplasmin from human bile / I.A. Verbina [et al.] // FEBS Lett. — 1992. — Vol. 298, N 2, 3. — P. 105–108
168. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes / A.B.Lerner [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 1958. – V. 80. – P. 2587
169. Jin R. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells / R. Jin, G. Yang, G. Li // Journal of Leukocyte Biology. – 2010. – V. 87, N 5. – P. 779–789

170. Johnston D.G. Acid-base balance in metabolic acidoses / D.G. Johnston, K.G. Alberti // *Clin. Endocrinol. Metab.* – 1983. – Vol. 12, N 2. – P. 267–285
171. Karlsson, K. Binding of human extracellular-superoxide dismutase C to cultured cell lines and to blood cells / K. Karlsson, S. L. Marklund // *Lab. Invest.* – 1989. – V. 60, № 5. – P. 659-666
172. Kataoka M. Identification of ceruloplasmin receptors on the surface of human blood monocytes, granulocytes and lymphocytes / M. Kataoka, M. Tavassoli // *Exp. Hematol.* — 1985. — Vol. 13, N 8. — P. 806–810
173. Kelly A. Disorders of glutamate metabolism / A. Kelly, C.A. Stanley // *Ment. Ret. Dev. Dis. Rev.* – 2001. – V. 7, N 4. – P. 287–295
174. Kennedy S.H. Strategies to achieve clinical effectiveness: refining existent therapies and pursuing emerging targets / S.H. Kennedy, A.H. Young, P. Blier // *J. Affect. Disord.* – 2011. – V. 132, Suppl 1. – P. S21–28
175. Kim J. Y. Innate inflammatory responses in stroke: mechanisms and potential therapeutic targets / J. Y. Kim, M. Kawabori, M. A. Yenari // *Current Medicinal Chemistry.* – 2014. V. 21, N 18. – P. 2076–2097
176. Kletzien R.F. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress / R.F. Kletzien, P.K. Harris, L.A. Foellmi // *Faseb. J.* – 1994. – V. 8. – P. 174–181
177. 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
178. Kraus R.J. Oxidized forms of ovine erythrocyte glutathione peroxidase. Cyanide inhibition of a 4-glutathione:4-selenoenzyme / R.J. Kraus, J.R. Prohaska, H.E. Ganther // *Biochim. Biophys. Acta/* - 1980. – V. 615. – P. 19–26

179. 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
180. Krinsky N.I. Carotenoid-radical interactions / N.I. Krinsky, K.J. Yeum // *Bio chem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – V. 6. – P. 754-760
181. Kuo M.T. Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities / M.T. Kuo // *Antioxid. Redox Signal.* - 2009. - V.11, N1. - P. 99-133
182. 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
183. Kupsco A. Oxidative Stress, Unfolded Protein Response, and Apoptosis in Developmental Toxicity / A. Kupsco, D. Schlenk // *Int Rev Cell Mol Biol.* – 2015. – V. 317. – P. 1–66
184. 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
185. Levels of neurotransmitter amino acids in the cerebrospinal fluid of patients with acute ischemic insult / V. I. Skvortsova [et al.] // *Neurosci Behav Physiol.* – 2000. – V. 30, N 5. – P. 491-495
186. Li C. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury / C. Li, R.M. Jackson // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2002. – Vol. 282. – P. C227–C241
187. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons / P. Lipton // *Physiol. Rev.* - 1999. - № 79 (4). - P. 1431-1568
188. Livak K.J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods.* – 2001. – V. 25, № 4. – P. 402-408
189. Localization of cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in the peroxisomes of rat liver cells: biochemical and immunocytochemical

- studies / T. Yoshihara [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 2001. – V. 49. – P. 1123–1131
190. Love S. Oxidative Stress in Brain Ischemia / S. Love // *Brain Pathol.* – 1999. – Vol. 9, N 1. – P. 119–131
191. Lu S.C. Glutathione synthesis / S.C. Lu // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2013. – V. 1830. – P. 3143–3153
192. Lukyanova L.D. Role of proinflammatory factors, nitric oxide, and some parameters of lipid metabolism in the development of immediate adaptation to hypoxia and HIF-1a accumulation / L.D. Lukyanova, G.V. Sukoyan, Y.I. Kirova // *Bull. Exp. Biol. Med.* - 2013. - V.154, N5. - P. 597-601
193. 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
194. 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
195. Maestroni G.J. The immunotherapeutic potential of melatonin / G.J. Maestroni // *Expert Opin. Invest. Drugs.* – 2001. – V. 10. – P. 467–476
196. Marklund, S. L. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines / S. L. Marklund // *Biochem. J.* – 1990. – V. 266, № 1. – P. 213-219
197. Marklund, S. L. Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung / S.L. Marklund // *Biochem. J.* – 1984. – V. 220, № 1. – P. 269-272

198. Masana M.J. Circadian rhythm of MT 1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus of the C3H/HeN mouse / M.J. Masana, S. Benlousif, M.L. Dubocovich // *J. Pineal Res.* – 2000. – V. 28. – P. 185–192
199. Mayer B. Mitochondrial regulation of apoptosis / B. Mayer, R. Oberbauer // *News Physiol. Sci.* – 2003. – Vol. 18. – P. 89–94
200. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease / L.E. Tebay [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2015. – V. 88 (Pt B). – P. 108-146
201. Meister A. Coenzymes and Cofactors / A. Meister // Wiley. – 1989. – V. 3A. – P. 1-48
202. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production / S. Garcia-Maurino [et al.] // *Life Sci.* – 1999. – V. 65. – P. 2143–2150
203. 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
204. Melatonin Attenuates Memory Impairment Induced by Klotho Gene Deficiency Via Interactive Signaling Between MT2 Receptor, ERK, and Nrf2-Related Antioxidant Potential / E.J. Shin [et al.] // *Int J Neuropsychopharmacol.* – 2015. – V. 18, N 6: pyu105
205. 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
206. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions / A. Slominski [et al.] // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2008. – V. 19. – P. 17–24
207. Melatonin inhibits AP-2 β /hTERT, NF- κ B/COX-2 and Akt/ERK and activates caspase/Cyto C signaling to enhance the antitumor activity of berberine in lung cancer cells / J.J. Lu [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – V. 7, N 3. – P. 2985-3001

208. Melatonin modulates microsomal PGE synthase 1 and NF-E2-related factor-2-regulated antioxidant enzyme expression in LPS-induced murine peritoneal macrophages / M. Aparicio-Soto [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2014. – V. 171, N 1. – P. 134-144
209. 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
210. Melatonin receptors in PC3 human prostate tumor cells / E. Gilad [et al.] // *J. Pineal Res.* – 1999. – V. 26. – P. 211–220
211. 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
212. Melatonin Therapy in Patients with Alzheimer's Disease / D.P. Cardinali [et al.] // *Antioxidants (Basel).* – 2014. – V. 3, N 2. – P. 245–277
213. Melatonin: An Established Antioxidant Worthy of Use in Clinical Trials / A. Korkmaz [et al.] // *Mol Med.* – 2009. – V. 15, N 1-2. – P. 43-50
214. Melatonin: Buffering the Immune System / A. Carrillo-Vico [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2013. – V. 14, N 4. – P 8638-8683
215. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits / S. Tordjman [et al.] // *Curr Neuropharmacol.* – 2017. – V. 15, N 3. – P. 434–443
216. Melatonin's unique radical scavenging properties – roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs / B. Pöggeler [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2002. – V. 33. – P. 20–30
217. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450 / X. Ma [et al.] // *Drug Metab. Dispos.* – 2005. – V. 33. – P. 489–494
218. Methazolamide and Melatonin Inhibit Mitochondrial Cytochrome C Release and Are Neuroprotective in Experimental Models of Ischemic Injury / X. Wang [et al.] // *Stroke.* – 2009. – V. 40, N 5. – P. 1877-1885

219. Methylophopogonanone a protects against cerebral ischemia/reperfusion injury and attenuates blood-brain barrier disruption / M. Lin // PLoS ONE. – 2015. – V. 10, N 4. - e0124558
220. Mitochondrionuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis / E. Daugas, S.A. Susin, N. Zamzami et al. // FASEB J. – 2000. – Vol. 14. – P. 729–739
221. Mittl P.R.E. Structure of glutathione reductase from Escherichia coli at 1.86 Å resolution: comparison with the enzyme from human erythrocytes and / P.R.E. Mittl, G.E. Schulz // Protein Sci. – 1994. – V. 3. – P. 799-809
222. Modulation of talA gene in pentose phosphate pathway for overproduction of poly-beta-hydroxybutyrate in transformed Escherichia coli harboring phbCAB operon / B.C. Song [et al.] // J. Biosci. Bioeng. – 2006. – V. 102. – P. 237–240
223. 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
224. Molecular mechanisms of “off-on switch” of activities of human IDH1 by tumor-associated mutation R132H / B. Yang [et al.] // Cell research. – 2010. – V. 20. – P. 1188-1200
225. Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers / S. Proietti [et al.] // Cell Mol. Life Sci. – 2013. – V. 70. – P. 2139–2157
226. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors / M.L. Dubocovich [et al.] // Front Biosci. – 2003. – V. 8. – P. 1093–1108
227. Morel F. The glutathione transferase kappa family / F. Morel, C. Aninat // Drug Metabolism Reviews. – 2011. – V. 43. – P. 281–291

228. Morrison H. W. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion / H. W. Morrison, J. A. Filosa // *Journal of Neuroinflammation*. – 2013. – V. 10. – article 4
229. Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue-specific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization / R. J. Folz [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 1997. – V. 17, № 4. – P. 393-403
230. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melaton in metabolite, functions as a potent antioxidant / D.X.Tan [et al.] // *FASEB J.* – 2001. – V. 15, № 12. – C. 2294-2296
231. NADPH production by the pentose phosphate pathway in the zona fasciculata of rat adrenal gland / W.M. Frederiks [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 2007. – V. 55. – P. 975–980
232. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here / M.K. Tobin [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2014. – V. 34, N 10. – P. 1573–1584
233. New insights for FOXO and cell fate decision in HIV infection and HIV-associated neurocognitive disorder / M. Cui [et al.] // *Adv Exp Med Biol.* – 2009. – V. 665. – P. 143-159
234. Nikinmaa M. Oxygen and carbon dioxide transport in vertebrate erythrocytes: an evolutionary change in the role of membrane transport / M. Nikinmaa // *J. Experim. Biol.* – 1997. – Vol. 200, N 2. – P. 369–380
235. Nitric oxide synthase inhibition and extracellular glutamate concentration after cerebral ischemia/reperfusion. / J. Zhang [et al.] // *Stroke*. – 1995. – Vol. 26, № 2. – P. 298-304
236. Nitric Oxide Synthetase Activity in Cerebral Post-Ischemic Reperfusion and Effects of L-NG-Nitroarginine and 7-Nitroindazole on the Survival / V. Sorrenti [et al.] // *Neurochem. Res.* – 1999. – Vol. 24, N 7. – P. 861–866

237. Novel effects of nitric oxide / K.L. Davis [et al.] // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 2001. – V. 41. – P. 203-236
238. 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
239. Nozik-Grayck, E. Extracellular superoxide dismutase / E. Nozik-Grayck, H. B. Suliman, C. A. Piantadosi // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2005. – V. 37, № 12. – P. 2466-2471
240. O'Manony D. Nitric oxide in acute ischaemic stroke: a target for neuroprotection // D. O'Manony, M.J. Kendall // *Neurol., Neurosurg. and Psychiatr.* – 1999. – Vol. 67. – P. 1–3
241. Oakley A. Glutathione transferases: a structural perspective / A. Oakley // *Drug Metabolism Reviews*. – 2011. – V. 43. – P. 138–151
242. Oeckinghaus A. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation / A. Oeckinghaus, S. Ghosh // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2009. V. 1, N 4. – article a000034
243. Ookhtens M. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine / M. Ookhtens, N. Kaplowitz // *Seminars in Liver Disease*. – 1998. – V. 18. – P. 313–329
244. Orrenius S. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death / S. Orrenius, V. Gogvadze, B. Zhivotovsky // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. – 2007. – V. 47. – P. 143–183
245. 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
246. Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection / H. Chen [et al.] // *Antioxid Redox Signal*. – 2011. – V. 14, N 8. – P. 1505-1517

247. Pacini N. Oncostatic-Cytoprotective Effect of Melatonin and Other Bioactive Molecules: A Common Target in Mitochondrial Respiration / N. Pacini, F. Borziani // *Int J Mol Sci.* – 2016. – V. 17, N 3:341
248. 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
249. Padmaja S. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite / S. Padmaja, G.L. Squadrito, W.A. Pryor // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998. – V. 349. – P. 1–6
250. Pan Y. Expression of ceruloplasmin gene in human and rat lymphocytes // Y. Pan, K. Katula, M.L. Failla // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1996. — Vol. 1307, N 2. — P. 233–238
251. 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
252. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1 / J.E. Ladner [et al.] // *Biochemistry.* – 2004. – V. 43. – P. 352–361
253. Pathophysiologische Effekte von Stickoxid (NO) und Endothelin-1 bei globaler zerebraler Ischämie im Tiermodell – ein Überblick / A. Strasser [et al.] // *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie.* – 1999. – Vol. 32, N 1. – P. 33 – 40
254. Phenotypic dysregulation of microglial activation in young offspring rats with maternal sleep deprivation-induced cognitive impairment / Q. Zhao [et al.] // *Scientific Reports.* – 2015. – V. 5. – article 9513
255. Physical and chemical studies on ceruloplasmin V. Metabolic studies on sialic acidfree ceruloplasmin in vivo / A.G. Morell [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 1968. — Vol. 243, N 1. — P. 155–159

256. 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
257. Post-ischemic inflammation in the brain / T. Shichita [et al.] // *Frontiers in Immunology.* – 2012. – V. 3. – article 132
258. Postischemic Reperfusion Injury Can Be Attenuated by Oxygen Tension Control / T. Kaneda [et al.] // *Jpn. Circ. J.* – 2001. – Vol. 65, N 3. – P. 213–218
259. Profiles of glutamate and GABA efflux in core versus peripheral zones of focal cerebral ischemia in mice. / X. Wang [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2001. – Vol. 313, № 3. – P. 121-124
260. Protecting the Melatonin Rhythm through Circadian Healthy Light Exposure / M.A. Bonmati-Carrion [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2014. – V. 15, N 12. – P. 23448-23500
261. Proteomic analysis of cellular response to oxidative stress / T. Rabilloud [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 19396–19401
262. Purification and properties of glutathione peroxidase from human liver / T. Miwa [et al.] // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* – 1983. – V. 31. – P. 179–185
263. Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury / R. Berti [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* – 2002. – V. 22, N 9. – P. 1068–1079
264. 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
265. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release, a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes / D.B. Zorov [et al.] // *J. Exp. Med.* - 2000. - V.192. - P. 1001-1014

266. Reduced Brain Edema and Infarction Volume in Mice Lacking the Neuronal Isoform of Nitric Oxide Synthase After Transient MeA Occlusion / H. Hara [et al.] // *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* – 1996. – Vol. 16, N 4. – P. 605 – 611
267. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin / C. Rodriguez [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2004. – V. 36. – P. 1–9
268. Ridder D. A. NF- κ B signaling in cerebral ischemia / D. A. Ridder, M. Schwaninger // *Neuroscience.* – 2009. – V. 158, N 3. – P. 995–1006
269. Rigo, A. Competitive inhibition of Cu, Zn-superoxide dismutase / A. Rigo, R. Stevanado, P. Viglino // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1977. – V. 79, № 3. – P. 776-783
270. Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure / B.K. Siesjö [et al.] // *Acta Neurochir Suppl.* – 1999. – V. 73. – P. 7–13
271. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke / R. Jin [et al.] // *Journal of Cardiovascular Translational Research.* – 2013. – V. 6, N 5. – P. 834–851
272. Role of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP⁺-ICDH) on cellular defence against oxidative injury by gamma-rays / S.H. Lee [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2004. – V. 80. –P. 635-642
273. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease / J.N. Weiss, P. Korge, H.M. Honda, P. Ping // *Circ. Res.* – 2003. – Vol. 93. – P. 292–301
274. Rotilio, G. A pulse radiolysis study of superoxide dismutase / G. Rotilio, R. C. Bray, E. M. Fielden // *Biochim. et Biophys. Acta.* – 1972. – V. 268, № 2. – P. 605-609
275. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease / G.L. Semenza // *Annu Rev Physiol.* – 2014. – V. 76. – P. 39-56
276. Siesjo B.K. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a

- unifying hypothesis / B.K. Siesjo, F. Bengtsson // *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* – 1989. – Vol. 9, N 2. – P. 127–14
277. Siesjo B.K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology / B.K. Siesjo // *J. Neurosurg.* – 1992. – Vol. 77, N 2. – P. 169–184
278. Simats A. Neuroinflammatory biomarkers: from stroke diagnosis and prognosis to therapy / A. Simats, T. García-Berrocso, J. Montaner // *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Basis of Disease.* – 2016. V. 1862, N 3. – P. 411–424
279. Simko F. Melatonin as a potential antihypertensive treatment / F. Simko, L. Paulis // *J. Pineal Res.* – 2007. – V. 42. – P. 319–322
280. Skrzycki, M. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) – structure, properties and functions / M. Skrzycki, H. Czeczot // *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online).* – 2004. – V. 58. – P. 301-311
281. Skulachev V.P. Mitochondria targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases / V.P. Skulachev // *J. of Alzheimers Dis.* - 2012. - V.28, N2. - P. 283-289
282. Skulachev V.P. Programmed death phenomena: from organelle to organism / V.P. Skulachev // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 959. – P. 214–237
283. Stevens M.D. Specific receptor for ceruloplasmin in membrane fragments from aortic and heart tissues / M.D. Stevens, R.A. DiSilvestro, E.D. Harris // *Biochemistry.* — 1984. — Vol. 23, N 2. — P. 261–266
284. Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C / F. Puskas [et al.] // *FASEB J.* – 2000. – V. 14. – P. 1352–1361
285. Stralin, P. Oxidative stress, NO* and smooth muscle cell extracellular superoxide dismutase expression / P. Stralin, H. Jacobsson, S. L. Marklund // *Biochim. Biophys Acta.* – 2003. – V. 1619, № 1. – P. 1-8

286. Structural and Functional Properties of isocitrate dehydrogenase from the psychrophilic bacterium *Desulfotalea psychrophila* reveal a cold-active enzyme with an unusual high thermal stability / A.E. Fedoy [et al.] // *Journal of Molecular Biology* – 2007. – V. 372. – P. 130-149
287. Structure and quantum chemical analysis of NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase: hydride transfer and co-factor specificity / K. Imada [et al.] // *Proteins*. – 2008. – V. 70. – P. 63-71
288. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity / X. Xu [et al.] // *The Journal of biological chemistry* – 2004. – V. 279. – P. 33946-33957
289. Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity / R.M. Green [et al.] // *Mutagenesis*. – 2006. – V. 21. – P. 383–390
290. Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance / S.G. Rhee [et al.] // *Kidney International Supplement*. – 2007. – V. 72. – P. S3–S8
291. 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
292. Takahashi N. Single-chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule / N. Takahashi, T.L. Ortel, F. W. Putnam // *Proc. Nat. Acad. Sci.* — 1984. — Vol. 81. — P. 390–394
293. Tew K.D. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death / K.D. Tew, D.M. Townsend // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2012. – V. 17. – P. 1728–1737

294. The dual nature of human extracellular superoxide dismutase: one sequence and two structures / S. V. Petersen [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2003. – V. 100, № 24. – P. 13875-13880
295. The importance of glutathione in human disease / S. Toppo [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2003. – V. 57. –P. 145–155
296. The interaction of ceruloplasmin with Kupffer cells / L. Dini [et al.] // *Eur. J. Cell. Biol.* — 1990. — Vol. 52, N 2. — P. 207–212
297. The mechanism of interaction of ceruloplasmin with superoxide radicals / A. Sergeev [et al.] // *Int. J. Biochem.* — 1993. — Vol. 25, N 11. — P. 1549–1554
298. 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
299. The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line / J. Petranka [et al.] // *J. Pineal Res.* – 1999. – V. 26. – P. 129–136
300. The pentose phosphate cycle is regulated by NADPH/NADP ratio in rat liver / I. Fabregat [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1985. – V. 236. – P. 110–118
301. The physiopathological significance of ceruloplasmin. A possible therapeutic approach / G. Floris [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* — 2000. — Vol. 60, N 12. — P. 1735–1741
302. The Protective Effect of Melatonin on Neural Stem Cell against LPS-Induced Inflammation / J. Song [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2015. – V. 2015:854359
303. Therapeutically targeting neuroinflammation and microglia after acute ischemic stroke / Y. Lee [et al.] // *BioMed Research International.* – 2014. – V. 2014: 297241
304. Thomas T. Ceruloplasmin gene expression in the rat uterus / T. Thomas, A. Macpherson, P. Rogers // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1995. — Vol. 1261, N 1. — P. 77–82

305. Trendelenburg G. Molecular regulation of cell fate in cerebral ischemia: role of the inflammasome and connected pathways / G. Trendelenburg // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2014. V. 34, N 12. – P. 1857–1867
306. Two distinct components of initial glutamate release synchronized with anoxic depolarization in rat global brain ischemia / S. Asai [et al.] // *Neuroreport*. – 2000 V. 11, N 13. – P. 2947-52
307. Ufer C. The roles of glutathione peroxidases during embryo development / C. Ufer, C.C. Wang // *Front. Mol. Neurosci*. – 2011. – V. 4. – P. 12
308. Upregulation of neuronal zinc finger protein A20 expression is required for electroacupuncture to attenuate the cerebral inflammatory injury mediated by the nuclear factor-kB signaling pathway in cerebral ischemia/reperfusion rats / J. Zhan [et al.] // *J Neuroinflammation*. – 2016. – V. 13, N1. – P. 258
309. 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
310. Walker E. J. TIMP-3 and MMP-3 contribute to delayed inflammation and hippocampal neuronal death following global ischemia / E. J. Walker, G. A. Rosenberg. *Experimental Neurology*. – 2009. – V. 216, N 1. – P. 122–131
311. Wang Y. TLR2 and TLR4 in the brain injury caused by cerebral ischemia and reperfusion / Y. Wang, P. Ge, Y. Zhu // *Mediators of Inflammation*. – 2013. – V. 2013: 124614
312. Wu B. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery / B. Wu, D. Dong // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2012. – V. 33. – P. 656–668

313. Xu C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions / C. Xu, B. BaillyMaitre, J.C. Reed // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 2656–2664
314. Yamazaki Y. Metalation states versus enzyme activities of Cu, Zn-superoxidedismutase probed by electrospray ionization mass spectrometry / Y. Yamazaki, T. Takao // *Anal. Chem.* – 2008. – V. 80, № 21. – P. 8246–8252
315. Yilmaz G. Leukocyte recruitment and ischemic brain injury / G. Yilmaz, D. N. Granger // *NeuroMolecular Medicine.* – 2010. V. 12, N 2. – P. 193–204
316. Yost F.J. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli* / F. J. Yost, I. Fridovich // *The J. of Biol. Chem.* – 1973. – V. 248, № 11. – P. 4905-4906
317. Zelko I. N. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu, Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression / I. N. Zelko, T. J. Mariani, R. J. Folz // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – V. 33, № 3. – P. 337-349