

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

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Воронеж – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет»

Научный руководитель доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ,
Попова Татьяна Николаевна

Официальные оппоненты: **Ягужинский Лев Сергеевич**
доктор химических наук, профессор,
Научно-исследовательский институт
физико-химической биологии имени А.Н.
Белозерского Московского
государственного университета имени
М.В. Ломоносова, лаборатория структуры
и функции мембран, руководитель

Дерябина Юлия Ивановна
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник, ФГУ
«Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии
наук», лаборатория экологической и
эволюционной биохимии, заведующая

Ведущая организация ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет»

Защита диссертации состоится 20 декабря 2018 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д.212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394018, Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Минобрнауки Российской Федерации и на сайте Воронежского государственного университета <http://www.science.vsu.ru>.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского госуниверситета

Автореферат разослан «18» октября 2018 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Грабович М.Ю.

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 (Чуканова Е.И., 2017).

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 (Lipton P., 1999). Восстановление кровоснабжения после ишемического периода, называемое реперфузией, способно привести к усугублению нарушений обменных процессов в головном мозге и формированию реперфузионного повреждения (Zhao H., 2012).

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 (Федорова Т.Н., 1999). Защиту от негативного действия свободных радикалов на биомолекулы обеспечивает антиоксидантная система (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 метаболических нарушений, возникающих в ходе развивающегося при этом 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 (Celinski K., 2011). 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 (Rodriguez C., 2004). 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-κB 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-корригирующих 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 NIF1 и NF-kB – главных регуляторов потребления клетками кислорода и формирования воспалительного ответа. Обнаружено, что возраставшая 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, 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект и материалы исследования: В качестве материала для исследований использовали головной мозг и сыворотку крови белых лабораторных крыс-самцов массой 200-250 г. Животные в ходе работы были разделены на восемь экспериментальных групп: 1-ая группа (n=22) состояла из ложнооперированных крыс; животным 2-ой группы (n=31) индуцировали ИРГМ путем 30-минутной окклюзии общих сонных артерий (Бульон ВВ., 2000); 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.

Подготовка материала для исследования. После вскрытия черепной коробки мозг несколько раз промывали ледяным физиологическим раствором, затем осушали фильтровальной бумагой и взвешивали. Для приготовления гомогената головного мозга осуществляли его измельчение 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.

Развитие ИРГМ оценивали по содержанию в головном мозге крыс лактата. Данный показатель 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.

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

Определение интенсивности СО. Интенсивность СО оценивали с помощью метода железоиндуцированной биохемиллюминесценции с использованием биохемиллюминометра 07М с программным обеспечением. Кинетическую кривую биохемиллюминесценции регистрировали в течение 30 секунд и анализировали такие параметры, как интенсивность вспышки (I_{max}), светосумму (S), и величину тангенса угла наклона касательной к нисходящей ветви кривой ($tg\alpha_2$). Концентрацию диеновых конъюгатов (ДК) определяли спектрофотометрически при длине волны 233 нм. Оценку степени окислительной модификации белков (ОМБ) осуществляли на основе способности взаимодействия карбонильных остатков аминокислот с 2,4-динитрофенил-гидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов (Дубинина Е.Е., 1995).

Оценку степени развития апоптотических процессов проводили на основе анализа степени фрагментации ДНК и активности каспазы-3 и каспазы-8. Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «К-Сорб» (Синтол, Россия). Степень фрагментации ДНК определяли методом агарозного гель-электрофореза с окрашиванием бромистым этидием. Определение активности каспаз проводили с помощью набора реактивов Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric и Caspase 8 Assay Kit, Colorimetric («BioVision», США).

Определение активности ферментов. Активность ферментов исследовали на спектрофотометре Hitachi U – 1900. О скорости ферментативных реакций, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАДФ, судили по изменению оптической плотности при 340 нм. Скорость реакций, катализируемых Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ, оценивали по возрастанию оптической плотности за счет восстановления НАДФ. Скорость

протекания ГР-реакции анализировали по уменьшению оптической плотности в результате окисления НАДФН. О скорости ГП-реакции судили по снижению оптической плотности при окислении НАДФН, происходящем в процессе восстановления под действием ГР окисленного глутатиона – продукта ГП-реакции. Анализ активности ГТ осуществляли по увеличению оптической плотности при 340 нм в результате превращения 1-хлор, 2,4-динитробензола в глутатион-2,4-динитробензол. Активность АГ определяли по увеличению оптической плотности при 233 нм, сопряженному с образованием двойной связи в молекуле цис-аконитата. Активность каталазы определяли методом, основанном на способности H_2O_2 и молибдата аммония образовывать стойкий окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при 410 нм. Активность ферментов в тканях крыс выражали в Е на грамм сырой массы, Е на мл сыворотки и в виде удельной активности. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкМ продукта реакции за 1 мин при температуре 25°C. Активность СОД оценивали по ингибированию скорости восстановления тетразолия нитросинего в неэнзиматической системе феназинметасульфата и НАДН при 540 нм (Матюшин Б.Н., 1991). Содержание общего белка определяли унифицированным биуретовым методом.

Измерение уровня мРНК генов антиоксидантных ферментов и транскрипционных факторов. Уровень транскриптов генов оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Выделение суммарной клеточной РНК производили с использованием набора «Extract RNA» (Евроген, Россия). Для синтеза первой цепи комплементарной ДНК использовали рекомбинантную обратную транскриптазу вируса мышиноного лейкоза Молони – М-MuLV. Для амплификации интересующих участков генов был разработан комплект генспецифических праймеров, с использованием программного обеспечения «Universal ProbeLibrary Assay Design Center». Праймеры по предоставленным последовательностям были синтезированы фирмой ЗАО «Евроген» (Россия). Для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR GreenI использовали набор реактивов фирмы «Евроген» (Россия). Исследование проводили на приборе АНК – 32 по следующей схеме: первоначальный прогрев смеси в течении 3 минут при 95°C, затем 40 циклов, состоящих из этапов денатурации (95°C – 15 секунд), отжига праймеров (60°C – 15 секунд) и элонгации (72°C – 30 секунд). Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов осуществляли с применением $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ метода (Livak K.J., 2001).

Анализ содержания низкомолекулярных антиоксидантов. Концентрацию GSH определяли методом, основанном на способности сульфгидрильной группы GSH вступать в реакцию с 5,5- дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой (реактив Элмана), с образованием в эквимольных количествах тионитрофенильного аниона, имеющего желтую окраску и максимум поглощения при 412 нм (Бузлама В.С., 1997). Концентрацию цитрата оценивали по методу Нательсона при длине волны 430 нм (Афанасьев В.Г., 1973).

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 $p < 0,05$ (Калаева Е.А., 2016).

АНАЛИЗ ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕЛАКСЕНА И ЭПИФАМИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ НЕЙРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ КРЫС С ИШЕМИЕЙ/РЕПЕРFUЗИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

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. 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 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.

Проведенные исследования показали, что использование мелатонин-корригирующих препаратов способствовало снижению в мозге концентрации лактата – продукта анаэробного катаболизма глюкозы, возраставшей 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.

В ходе работы было показано возрастание показателей интенсивности СО у животных с ИРГМ, что согласуется с полученными ранее данными (Сафонова О.А., 2009). Введение мелаксена и эпифамина крысам с патологией оказывало, по-видимому, смягчающий эффект на состояние оксидативного стресса, что выражалось в изменении соответствующих показателей и было обусловлено коррекцией уровня мелатонина в организме животных. 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. Наблюдалось в данных условиях и падение концентрации ДК в мозге и сыворотке крыс на 42 и 37 % (рис. 1), снижение уровня карбонильных остатков аминокислот в белках составило 17 и 39 % соответственно, относительно значений у животных с патологией. Позитивное воздействие тестируемые препараты оказывали и на функционирование АГ. Активность данного фермента, представленная в Е/г сырой массы ткани мозга и Е/мл сыворотки крови животных, возрастала на 134 и 104 %, относительно показателей второй экспериментальной группы, причем схожие изменения наблюдались и для удельной активности фермента. Содержание цитрата при этом уменьшалось в мозге и сыворотке крови крыс на 133 и 149%. По-видимому, наблюдаемые изменения были обусловлены воздействием мелатонина, уровень которого в организме животных повышался в условиях введения тестируемых препаратов.

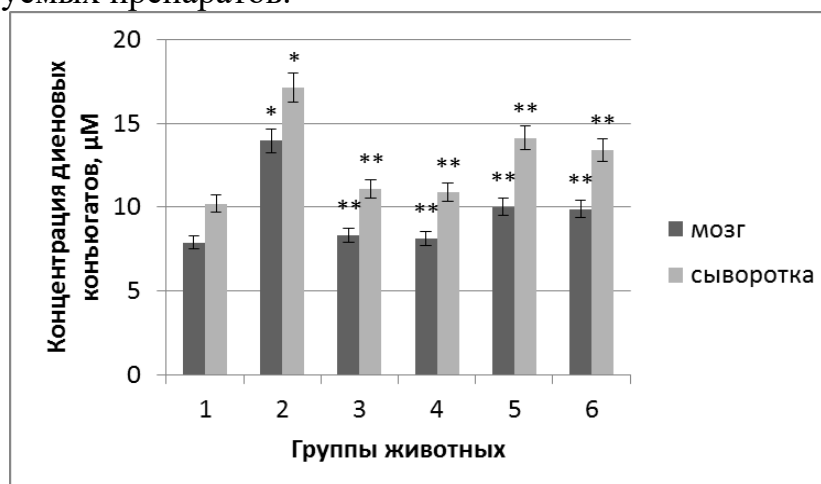


Рис. 1. Концентрация диеновых конъюгатов в мозге и сыворотке крови ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг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

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 (Zhan J., 2016). 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 (Semenza G.L., 2014). Как показали проведенные исследования, развитие ИРГМ сопровождалось возрастанием уровней мРНК факторов NF-kB 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. По-видимому, достаточно мощная антиокислительная активность мелатонина, уровень которого корректировался тестируемыми препаратами, приводила к уменьшению выраженности оксидативного стресса и, как следствие, торможению индукции фактора NF-kB. Известно также, что в условиях гипоксии мелатонин способен снижать активность индуцируемого фактора HIF-1 α (Pacini N., 2016).

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

Из литературы известно, что характерные для ИРГМ цитотоксические стимулы, такие как окислительный стресс, способны активировать апоптоз (Kalogeris T., 2016). Как известно, фрагментация молекул ДНК является маркером активизации апоптоза. Проведенные исследования показали, что для ДНК, выделенной из клеток головного мозга крыс с ИРГМ, была характерна фрагментация, степень которой была менее выражена после инъекций мелаксена (рис. 2).

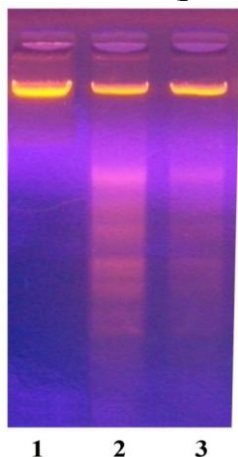


Рис. 2. Степень фрагментации ДНК из клеток мозга ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2) и животных, получавших на фоне развития патологии инъекции мелаксена в дозе 10 мг/кг (3).

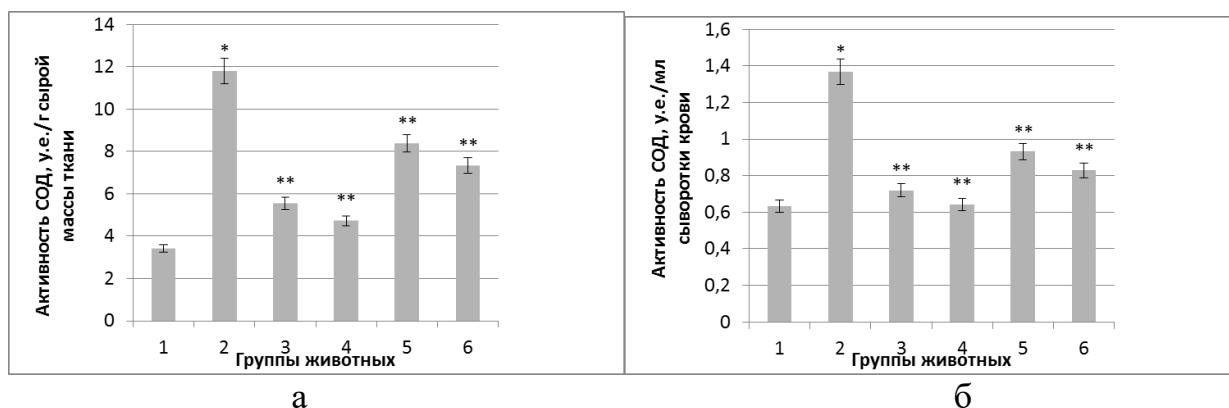
Ключевыми протеолитическими ферментами, реализующими программу апоптоза, являются каспазы. Результаты исследования показали, что в мозге животных второй экспериментальной группы активность каспазы-3 и каспазы-8 увеличивалась относительно контроля на 67% и 66% соответственно. Введение мелаксена на фоне развития ИРГМ способствовало снижению активности каспазы-3 и каспазы-8 на 32% и 37% относительно животных второй экспериментальной группы. Уменьшение выраженности апоптотических процессов у животных с ИРГМ под действием мелаксена могло быть связано с увеличением в организме экспериментальных животных уровня мелатонина. 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 (Bonmati-Carrion M.A., 2014). Согласно имеющимся сведениям, мелатонин способен не только тормозить выделение цитохрома с и гибель клеток, но также ингибировать потерю потенциала митохондриальной мембраны, активацию каспазы-3 и каспазы-1 и апоптотические стимулы цитокина ИЛ-1 β (Wang X., 2009).

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

В ходе проведенных ранее исследований было показано, что моделирование ИРГМ у крыс сопровождалось возрастанием активности антиоксидантных ферментов (Макеева А.В., 2010). 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. 3). Введение мелатонин-корректирующих препаратов приводило к сдвигу исследуемых показателей в направлении контрольных значений. Наиболее выраженный эффект при этом наблюдался после введения мелаксена в дозе 10 мг/кг, что приводило 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. 3).

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. 3 г).



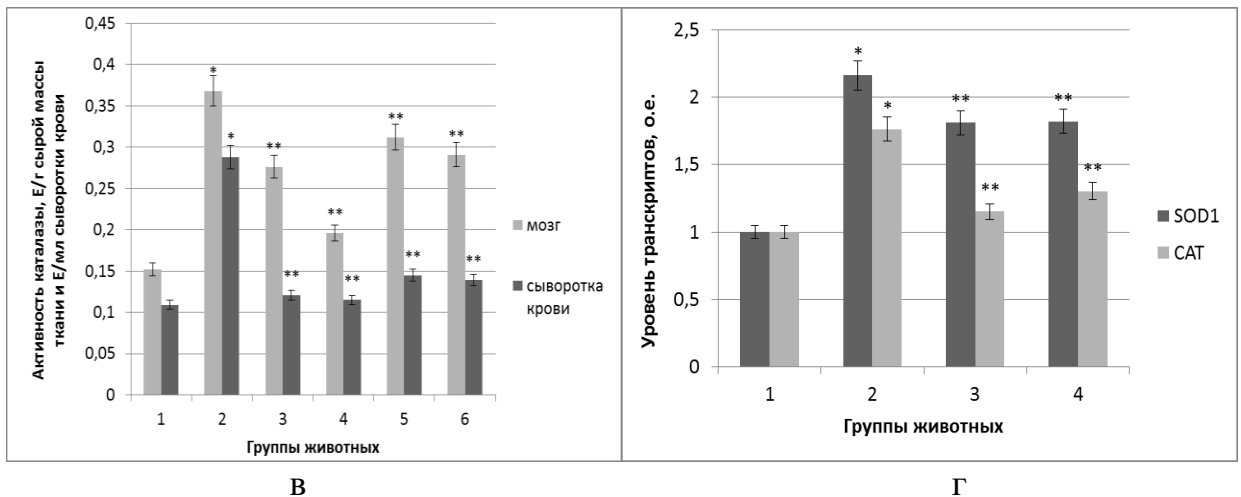


Рис. 3. А. Активность супероксиддисмутазы в виде Е/г сырой массы ткани мозга ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 5 мг/кг (3), 10 мг/кг (4), и эпифамина в дозе 1,25 мг/кг (5) и 2,5 мг/кг (6). 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). В. 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). Г. 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; $p < 0,05$.

Как показали проведенные исследования, развитие ИРГМ у крыс сопровождалось увеличением активности ГП, ГР и ГТ (Макеева А.В., 2009). При индукции патологии происходило также возрастание концентрации GSH в мозге и сыворотке крови лабораторных животных. 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. Введение мелатонин-корректирующих препаратов на фоне ИРГМ приводило к нормализации анализируемых параметров. Так, инъекции мелаксена в дозе 10 мг/кг 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. Концентрация GSH под воздействием тестируемых соединений изменялась в направлении контрольных значений. 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.

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 (Love S., 1999). Наблюдаемое уменьшение активности и уровня мРНК генов антиоксидантных ферментов 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 мелаксеном и эпифамином. 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 (Lowes D.A., 2013). Существенный вклад в смягчение дисбаланса между про- и антиокислительными процессами мог вносить также иммуномодулирующий эффект мелатонина и его нейропротекторные свойства (Carrillo-Vico A, 2013).

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 (Сафонова О.А., 2015). 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. 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.

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 (Hayes J.D., 2009). 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 (Ponugoti B., 2013). 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. 4).

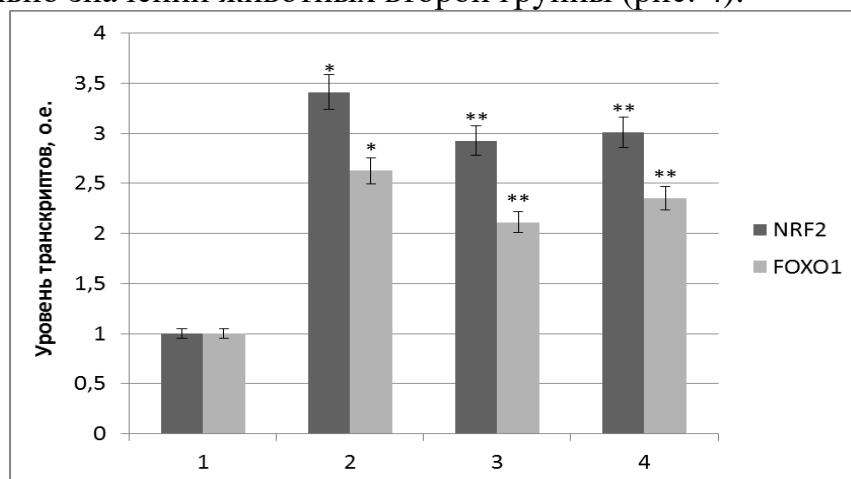


Рис. 4. Уровень транскриптов генов NRF2 и FOXO1 в мозге ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), а также животных, подвергнутых на фоне развития патологии инъекциям мелаксена в дозе 10 мг/кг (3), и эпифамина в дозе 2,5 мг/кг (4). Примечание: * - отличия от контрольной 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. 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 (Shin E.J., 2015) через транскрипционную активацию защитных генов. В ходе работы наблюдалось также возрастание уровня транскриптов гена редокс-чувствительного фактора FOXO1, с промотором которых способен связываться белок FOXO1, вызывая собственную экспрессию (Essagher A. 2009). 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. В группах животных, для которых было характерно возрастание в организме уровня мелатонина на фоне ИРГМ, наблюдалась нормализация работы антиоксидантной системы и уменьшение уровня транскриптов генов NRF2 и FOXO1. Причиной

происходящих изменений могла выступать выраженная 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 веществами.

Как показали проведенные исследования, введение мелаксена и эпифамина на фоне развития ИРГМ способствовало нормализации в головном мозге животных концентрации лактата, возраставшей при развитии патологии. По-видимому, торможению активизации анаэробного гликолиза способствовало снижение степени повреждения и энергодефицита нейронов (Гусев Е.И., 2001). Данные изменения могли иметь место в условиях проявления нейропротекторной активности мелатонином (Wang X., 2009), 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 (Lowes D.A., 2013). Кроме этого, метаболиты мелатонина также могут действовать как антиоксиданты, а сам гормон не способствует протеканию окислительных реакций (Fernando S., 2014).

Индукция у животных ИРГМ приводила к увеличению уровней транскриптов генов факторов NF- κ B и NIF1. Введение на фоне развития патологии мелатонин-корректирующих препаратов способствовало уменьшению исследуемых параметров, 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 (Aparicio-Soto M.,

2014). Мелатонин также способен в условиях гипоксии снижать активность индуцируемого фактора HIF-1 (Pacini N., 2016), 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 (Chen H., 2011). 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 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 (Bonmati-Carrion M.A., 2014), а с другой стороны – торможением потери потенциала митохондриальной мембраны, угнетением активации каспазы-3 и каспазы-1 и апоптотических стимулов цитокина ИЛ-1 β (Wang X., 2009). Помимо этого, было показано, что мелатонин усиливает экспрессию SIRT1 – сиртуина, который способствует выживанию путем ингибирования апоптоза или клеточного старения в клетках млекопитающих (Espino J., 2012).

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. Введение мелатонин-корректирующих препаратов способствовало, в свою очередь, к изменению содержания мРНК генов данных факторов в направлении контрольных показателей. Подобные изменения могли являться следствием уменьшения мобилизации защитных систем клеток вследствие проявления антиоксидантного эффекта мелатонином, уровень которого корректировался исследуемыми веществами. Как показали результаты работы, более

существенное позитивное влияние на исследуемые показатели оказывал мелаксен, содержащий синтетический аналог мелатонина, 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 эпителиальную 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. 5).

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. Под воздействием свободных радикалов происходила интенсификация процессов СО, в частности ПОЛ и ОМБ. Помимо этого, наблюдалось угнетение активности АГ и накопление субстрата данного фермента – цитрата. В условиях развития патологии было выявлено увеличение уровня транскриптов гена фактора NIF1 – главного регулятора клеточного ответа на гипоксию, и редокс-чувствительного фактора NF-kB, 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, нейропротекторный и антиокислительный эффекты которого обуславливали наблюдаемые изменения. Существенный вклад в нормализацию анализируемых параметров могло также вносить позитивное влияние мелатонина на функционирование ЭТЦ митохондрий, регуляцию протекания апоптотических и воспалительных процессов. Таким образом, выявленная в условиях ИРГМ активность мелатонин-корректирующих препаратов была сопряжена с выраженным прямым и опосредованным антиоксидантным действием мелатонина, обеспечивающим уменьшение степени окислительного стресса, нагрузки на защитные системы организма животных и, как следствие, снижение выраженности компенсаторного адаптивного ответа.

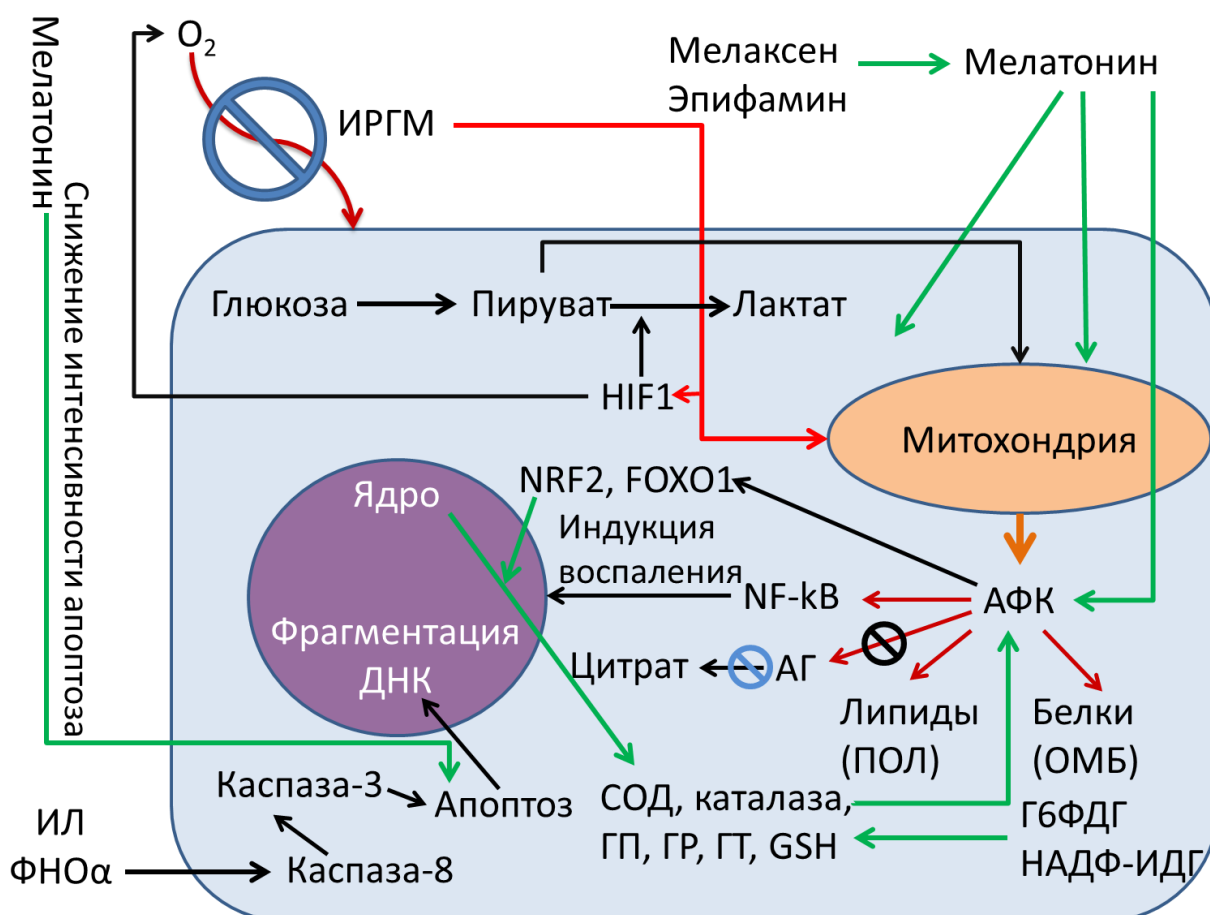


Рис. 5. Гипотетическая модель регуляции свободнорадикального гомеостаза, интенсивности апоптотических процессов и функционирования транскрипционных факторов, участвующих в реализации адаптивного ответа, воздействием мелатонин-корректирующих препаратов при ишемии/реперфузии головного мозга.

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 - HIF-1 и NF-kB, возросших 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 биохимилюминесценции, 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 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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Т.Н. Попова, О.А. Сафонова, А.О. Столярова. Оксидативный статус тканей крыс при введении мелаксена на фоне развития ишемии/реперфузии головного мозга // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 62, вып. 5. – С. 561-565.
2. Т.Н. Попова, О.А. Сафонова, А.О. Столярова, А.Н. Веревкин. Воздействие эпифамина на активность антиоксидантных и NADPH-генерирующих ферментов при экспериментальной ишемии/реперфузии головного мозга у крыс // Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64, вып. 1. – С. 31-37.
3. А.О. Столярова, Т.Н. Попова, О.А. Сафонова, Е.Д. Крыльский, Л.А. Кириченко, Р.С. Крутаков. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на активность аконитатгидратазы и содержание неферментативных антиоксидантов при ишемии-реперфузии головного мозга у крыс // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – № 2. – С. 164-171.
4. Т.Н. Попова, О.А. Сафонова, А.О. Столярова, Т.И. Рахманова, Л.Ф. Панченко. Активность глутатионовой системы и НАДФН-генерирующих ферментов при действии мелатонина на фоне ишемии/реперфузии головного мозга у крыс // Патологическая физиология и экспериментальная терапия – 2018. - №3. – С. 19-24.
5. Столярова А.О., Сафонова О.А., Попова Т.Н., Шульгин К.К., Агарков А.А., Рахманова Т.И., Сердюкова А.П. Оценка влияния мелаксена и N-сукцинилхитозана на активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в мозге крыс при развитии ишемии/реперфузии головного мозга // II Международная научно-практическая конференция. Основные проблемы в

- современной медицине. Сборник научных трудов по итогам конференции. Волгоград 10 октября 2015г. – С. 106-108.
6. Столярова А.О., Сафонова О.А., Попова Т.Н., Пушкарева Т.Н., Флягина А.В. Воздействие мелаксена на активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в сыворотке крови крыс при ишемии/реперфузии головного мозга // Сборник материалов 11 международной научно-практической конференции «Фундаментальная и прикладная наука». – Великобритания, 30 октября – 7 ноября 2015г. – Sheffield (UK): Science and Education Ltd, 2015. – С. 39-41.
 7. Столярова А.О., Попова Т.Н., Сафонова О.А., Пушкарева Т.Н., Флягина А.В. Активность аконитатгидратазы и содержание цитрата в сыворотке крови крыс при действии мелаксена на фоне развития ишемии/реперфузии головного мозга // Том 16. Материали за XI международна научна практична конференция. Бъдещето въпроси от света на науката – 2015. София (Болгария), 17 – 22 декември, 2015. – С. 86-88.
 8. Столярова А.О., Попова Т.Н., Сафонова О.А., Пушкарева Т.Н., Флягина А.В. Влияние мелаксена в различных дозах на активность супероксиддисмутазы и каталазы в сыворотке крови крыс при ишемии/реперфузии головного мозга // Мировая наука и обозрение: прошлое, настоящее и будущее. Материалы конференции. 15 декабря 2015. Ростов – на – Дону. - С. 20-22.
 9. Столярова А.О., Попова Т.Н., Сафонова О.А. Оценка дозозависимого воздействия мелаксена на параметры биохемилюминесценции при ишемии/реперфузии головного мозга у крыс // Актуальные вопросы развития территорий: теоретические и прикладные аспекты. Сборник статей студентов, магистрантов, аспирантов, молодых ученых и преподавателей. Выпуск 2. 7 марта 2016. Пермь 2016. – С. 123-125.
 10. Столярова А.О., Попова Т.Н., Сафонова О.А., Флягина А.В., Пушкарева Т.Ю., Кириченко Л.А., Землянухина А.С. Воздействие мелаксена в различных дозах на содержание диеновых конъюгатов в тканях крыс при ишемии/реперфузии головного мозга // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ. Материалы 6-й Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2016». г. Воронеж, 21-23 апреля 2016 г. – С. 523-526.
 11. Столярова А.О., Попова Т.Н., Сафонова О.А., Руденко Е.И., Пушкарева Т.Ю., Флягина А.М. Оценка влияния мелаксена на активность аконитатгидратазы и содержание цитрата в головном мозге крыс при развитии ишемии/реперфузии // Теоретико-концептуальные и методические подходы к развитию мировой науки и техники в XXI веке. Материалы конференции 27.04.15. Ростов – на – Дону. – С. 23-26.

12. Столярова А.О., Попова Т.Н., Сафонова О.А., Пушкарева Т.Ю., Флягина А.М. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в ткани головного мозга крыс при воздействии мелаксена в различных дозах на фоне развития ишемии/реперфузии // Университетская наука: Взгляд в будущее. Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 81-летию Курского государственного медицинского университета и 50-летию фармацевтического факультета (4-5 февраля 2016 года). Том II. Курск – 2016. – С. 390-392.
13. Аксилина Т.А., Столярова А.О., Крыльский Е.Д., Сафонова О.А., Попова Т.Н. Уровень транскриптов гена SOD1 и активность супероксиддисмутазы в мозге крыс при ишемии-реперфузии и действии мелаксена // НАУКА И СОВРЕМЕННОЕ ОБЩЕСТВО: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И РАЗВИТИЕ. Материалы IV Международной научно-практической конференции (Уфа, 15-16 декабря 2017 г.) Том 2 -- Уфа, 2017. -- С. 2-4.
14. Ряполова А.В., Столярова А.О., Крыльский Е.Д., Сафонова О.А., Попова Т.Н. Активность каталазы и уровень транскриптов гена CAT в мозге крыс при развитии экспериментальной ишемии-реперфузии и действии мелаксена // НАУКА И СОВРЕМЕННОЕ ОБЩЕСТВО: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И РАЗВИТИЕ. Материалы IV Международной научно-практической конференции (Уфа, 15-16 декабря 2017 г.) Том 2 -- Уфа, 2017. –С. 4-6.
15. Кириченко Л.А., Крыльский Е.Д., Столярова А.О. Активность глутатионредуктазы и уровень транскриптов генов GSR в головном мозге крыс при введении мелаксена на фоне ишемии/реперфузии// Актуальные направления научных исследований: перспективы развития. Материалы IV Международной научно-практической конференции (Чебоксары, 10 декабря 2017 г.) -- Чебоксары, 2017. – С. 18-20.
16. Крутаков Р.С., Столярова А.О., Сафонова О.А., Крыльский Е.Д., Попова Т.Н. Воздействие мелаксена на активность глутатионпероксидазы и уровень транскриптов гена GPX1 в мозге крыс при экспериментальной ишемии/реперфузии// Научно-практические исследования. – 2017. – Вып 8 (8). – С. 95-97.
17. Кириченко Л.А., Крутаков Р.С., Столярова А.О., Разуваев Г.А., Крыльский Е.Д. Влияние эпифамина на уровень мРНК генов транскрипционных факторов NRF2 и NIF1 в головном мозге крыс с экспериментальной ишемией/реперфузией// Исследования различных направлений современной науки. Материалы XXXVI Международной научно-практической конференции (Москва, 23 апреля 2018 г.) -- Москва, 2018. – С. 29-31.
18. Ряполова А.В., Аксилина Т.А., Столярова А.О., Крыльский Е.Д., Сафонова О.А., Попова Т.Н. Воздействие эпифамина на степень окислительной модификации белков в тканях крыс на фоне развития ишемии/реперфузии головного мозга //

НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ: проблемы, идеи, инновации. Материалы V Международной научно-практической конференции (Уфа, 29-30 апреля 2018 г.) -- Уфа, 2018. – С. 2-3.

19. Крыльский Е.Д., Акинина А.И., Рыжкова В.С., Разуваев Г.А., Столярова А.О. Воздействие эпифамина на функционирование каталазы в условиях ишемии/реперфузии головного мозга у крыс // Актуальные проблемы современной науки: сборник тезисов научных трудов XXXI Международной научно-практической конференции (Москва-Астана-Харьков-Вена, «29» июня 2018 года) – Международный научный центр, 2018. – С. 16-18.
20. Крыльский Е.Д., Рыжкова В.С., Акинина А.И., Разуваев Г.А., Столярова А.О. Функционирование глутатионпероксидазы в условиях введения эпифамина на фоне развития ишемии/реперфузии головного мозга у крыс // Актуальные проблемы современной науки: сборник тезисов научных трудов XXXI Международной научно-практической конференции (Москва-Астана-Харьков-Вена, «29» июня 2018 года) – Международный научный центр, 2018. – С. 19-21.

Публикации 1-4 представлены в журналах, рекомендованных ВАК РФ, из которых работы № 1 и 2 опубликованы в рецензируемых журналах в системе Web of Science, а работа № 4 – в рецензируемом журнале в системе Scopus.