

## ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕЛАТОНИН-КОРРИГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ НЕФЕРМЕНТАТИВНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

А. О. Столярова, Т. Н. Попова, О. А. Сафонова, Е. Д. Крыльский,  
Л. А. Кириченко, Р. С. Крутаков

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 22.01.2018 г.

**Аннотация.** К наиболее острым проблемам биомедицины в настоящее время относят нарушения мозгового кровообращения, одним из ключевых неспецифических факторов патогенеза которых выступает окислительный стресс. Вместе с тем, при развитии подобных нарушений защитных резервов антиокислительной системы организма может оказаться недостаточно, и целесообразными представляются исследования биологически активных соединений, обладающих антиоксидантной активностью, среди которых можно выделить гормон мелатонин. Целью работы стала оценка воздействия мелатонин-корректирующих препаратов – мелаксена и эпифамина, на активность аконитатгидратазы – чувствительную мишень действия свободных радикалов, содержание цитрата и  $\alpha$ -токоферола в мозге и сыворотке крови крыс с экспериментальной ишемией/реперфузией головного мозга. В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс, ишемию/реперфузию головного мозга у которых моделировали под наркозом путём 30-минутной окклюзии общих сонных артерий и последующего снятия окклюдоров. Оценка содержания лактата проводили с помощью диагностического набора фирмы «Витал» (Россия). Активность аконитатгидратазы определяли спектрофотометрически при 235 нм. Концентрацию цитрата определяли по методу Нательсона, уровень  $\alpha$ -токоферола оценивали по формированию комплексного соединения с  $Fe^{2+}$  и ортофенантролином. Как показали результаты исследования, введение мелаксена и эпифамина способствовало повышению активности аконитатгидратазы в мозге крыс в 2.3 и 1.5 раза, а в сыворотке крови – в 2.0 и 1.9 раза относительно показателей животных с патологией. В этих условиях вследствие возрастания активности фермента имело место уменьшение содержания цитрата в мозге и сыворотке крови животных, накапливающегося при патологии. Концентрация данного соединения снижалась при введении мелаксена соответственно в 2.5 и 1.8 раза, эпифамина – в 2.3 и 1.7 раза. Кроме того, применение мелатонин-корректирующих препаратов приводило к нормализации концентрации  $\alpha$ -токоферола, снижавшейся при патологии. Наблюдаемые изменения, по-видимому, были сопряжены со способностью тестируемых препаратов поддерживать оптимальный уровень мелатонина, обладающего нейропротекторным и антиоксидантным эффектом, а также способным оказывать позитивное регуляторное воздействие на неферментативную антиоксидантную систему.

**Ключевые слова:** мелатонин, ишемия/реперфузия, окислительный стресс, аконитатгидратаза, цитрат,  $\alpha$ -токоферол.

Нейропротекция и оптимизация терапевтических подходов к восстановлению больных, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения, до сих пор являются одними из наиболее актуальных задач в биомедицине. Существующее фармакологическое лечение нередко оказывается малоэффективным или приводит к неблагоприятным последствиям. Как известно, ткань мозга

весьма уязвима к дефициту кислорода, что обуславливает развитие в условиях ишемии глубоких морфофункциональных нарушений нейронов, формирование неврологических расстройств [1].

Среди наиболее существенных проявлений ишемического повреждения головного мозга можно выделить нарушение аэробной утилизации глюкозы в нейронах. Развивающейся при этом клеточный энергодефицит лежит в основе расстройств процессов ионного обмена нейронов и феномена эксайтотоксичности, является причиной необрати-

мого повреждения нервной ткани [2]. В последние годы были достигнуты определенные успехи в выявлении механизмов формирования ишемического повреждения головного мозга. Вместе с тем, остаются вопросы в понимании сдвигов клеточного метаболизма, а также механизмов восстановления или дополнительного повреждения нервной ткани в реперфузионном периоде [3]. Ишемическое и реперфузионное повреждение головного мозга сопровождается нарушением окислительно-восстановительного гомеостаза и приводит к изменению функционирования ферментов, вовлеченных в регуляцию соответствующих процессов [4].

Окислительный стресс (ОС) считается одной из наиболее существенных причин повреждения ткани, вызванной ишемией/реперфузией. Показано, что данное патологическое состояние сопряжено со значительным увеличением концентрации окислителей и кислородных радикалов в тканях [5]. Ишемия и реперфузия могут способствовать генерации активных форм кислорода (АФК), таких как супероксидный анион-радикал, гидроксильный радикал, пероксид водорода и оксид азота (NO), что является основным фактором, способствующим прогрессированию нарушения функционирования клеток [6]. Формирование АФК, индуцированное ишемией/реперфузией, является конечным результатом активации нескольких путей, продуцирующих оксиданты, таких как образование радикалов кислорода в митохондриях, функционирование ксантиноксидазы и никотинамидадениндинуклеотид-фосфат-оксидазы [7]. Кислородные радикалы вызывают пероксидное окисление липидов (ПОЛ), которое может привести к разрушению клеточной мембраны и митохондриальному повреждению, вызывающих гибель клеток [8]. Кроме того, образование АФК опосредуется рядом метаболических путей в различных органах и эндотелиальных клетках, сопряженных с хемотаксисом лейкоцитов к ишемизированной ткани [9]. ОС, возникающий при реперфузии, может опосредовать «кислородный парадокс» – состояние, при котором реоксигенизация ишемической ткани приводит к степени повреждения, значительно превышающей нарушения, вызванные только ишемией. Вместе с тем, в дополнение к прямым цитотоксическим эффектам ОС, чрезмерная генерация свободных радикалов индуцирует также образование медиаторов воспаления, что приводит к повреждениям тканей воспалительного характера [10, 11].

ОС может привести к нарушению баланса между оксидантами и системой антиоксидант-

ной защиты (АОС), играющей критическую роль в предотвращении окислительного повреждения при ишемии и реперфузии. Среди ключевых неферментативных антиоксидантов можно выделить витамин Е, который защищает внутренние митохондриальные мембраны и лизосомы от повреждающего действия радикалов, поддерживает функциональную целостность цитоплазматической мембраны клеток [12]. Важное место в неферментативном звене АОС занимает также цитрат, который относится к веществам-комплексонам, обладающим способностью хелатировать ионы металлов с переменной валентностью. Цитрат способен элиминировать ионы  $Fe^{2+}$ , участвующие в реакции Фентона, продуктом которой является чрезвычайно реакционноспособный гидроксильный радикал. Обратимую реакцию превращения цитрата в изоцитрат катализирует фермент аконитатгидратаза (КФ 4.2.1.3: АГ), рассматриваемый в настоящее время как чувствительная мишень действия свободных радикалов, поскольку его молекула легко разрушается АФК [13].

В последнее время большой интерес представляет изучение биологически активных веществ, обладающих антиоксидантным действием и способных корректировать функционирование АОС организма. Одним из таких веществ является мелатонин – гормон, секретируемый шишковидной железой и нейроэндокринными клетками желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей, поджелудочной железы, надпочечников, тимуса, мозжечка, мочеполовой системы и других органов. Мелатонин относится к производным аминокислот, принимает участие в синхронизации циркадных и сезонных биоритмов организма, участвует в регуляции репродуктивной и иммунной систем, тормозит некоторые функции гипоталамо-гипофизарной системы [14]. В ряде исследований показана его антиоксидантная активность, а также наличие противоопухолевого и антистрессового эффекта [15]. В настоящей работе тестируемыми препаратами являлись мелаксен, основным действующим веществом которого является мелатонин, и эпифамин, представляющий собой пептидный биорегулятор, тропный к гипоталамо-гипофизарной области и способный обеспечивать коррекцию содержания мелатонина в организме.

Целью работы явилась оценка воздействия мелаксена и эпифамина на активность АГ, содержание цитрата и  $\alpha$ -токоферола в мозге и сыворотке крови крыс на фоне развития ишемии/реперфузии головного мозга (ИРГМ).

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс массой 150-200 г, содержащихся на стандартном режиме вивария при 12-часовом световом дне. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отражённых в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). ИРГМ у животных моделировали под наркозом путём 30-минутной окклюзии общих сонных артерий и последующего снятия окклюдоров [16]. Восстановление кровотока контролировали визуально. Спустя 3-е суток животных забивали. Кровь забирали из сердца, головной мозг извлекали из черепной коробки по стандартной методике. Экспериментальные животные были разделены на 4 группы. В качестве контроля (1-ая группа) использовали ложнооперированных животных. 2-ую группу составили крысы с ИРГМ. В 3-ей группе животным с постишемической реперфузией ежедневно в течение 3-х дней в утренние часы вводили внутривентриально мелаксен (“Юнифарм”, США) в дозе 10 мг/кг веса в виде раствора в 0.5 мл 0.9 % NaCl. Крысам 4-ой группы на фоне ИРГМ вводили эпифамин аналогичным образом в дозе 2.5 мг/кг трижды в день на протяжении 3-х дней. Гомогенат головного мозга крысы получали путем гомогенизации навески ткани в трёхкратном объёме охлаждённой среды выделения (50 мМ трис-HCl-буфер (pH 7.8)), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол) и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Полученный гомогенат и сыворотку крови использовали для дальнейших исследований. Оценку содержания лактата проводили с помощью диагностического набора фирмы “Витал” (Россия). Активность АГ определяли спектрофотометрически при 233 нм в среде, содержащей 50 мМ трис-HCl-буфер (pH 7.8), 4 мМ цитрат. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 25°C. Для определения содержания белка использовали метод Лоури. Активность фермента выражали в виде Е/мл сыворотки крови, Е/г сырой массы ткани и удельной активности (Е/мг белка). Концентрацию цитрата определяли по методу Нательсона [17]. Концентрацию α-токоферола определяли по методике, основанной на фотометрировании хромогенного комплексного соединения Fe<sup>2+</sup> и ортофенантролина [18]. Эксперименты проводили как минимум в двукратной аналитической и 8-кратной

биологической повторностях. Результаты опытов сравнивали с контролем. Для статистической обработки использовали стандартные методы с применением t-критерия Стьюдента [19]. Обсуждаются статистически достоверные различия при p<0.05.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как известно, повреждение головного мозга, вызванное ишемией и реперфузией, приводит к угнетению аэробной утилизации глюкозы и активизации анаэробного гликолиза, направленного на компенсацию энергетического дефицита [20]. Накопление лактата, происходящее в результате данных метаболических изменений, приводит к формированию в ишемизированной ткани ацидоза, способствующего угнетению клеточного обмена веществ и ионного транспорта, оказывающего цитотоксическое действие посредством нарушения физико-химических свойств мембран нейронов, усугубляемого активизацией процессов свободнорадикального окисления [21]. Проведенные исследования показали, что использование мелатонин-корректирующих препаратов способствовало снижению в мозге концентрации лактата, возраставшей на фоне развития ИРГМ. Так, содержание данного метаболита уменьшалось при введении мелаксена в 3.2 раза, а эпифамина – в 3.0 раза относительно показателей животных второй экспериментальной группы (рис. 1). Позитивные изменения в энергетическом метаболизме мозга были обусловлены, судя по всему, способностью тестируемых препаратов корректировать в тканях животных уровень мелатонина, обладающего нейропротекторной активностью. Данный гормон обладает амфифильными свойствами, благодаря чему легко преодолевает все клеточные барьеры, включая гематоэнцефалический, свободно проходит через клеточные мембраны. Системные защитные свойства мелатонина связаны с синхронизацией активности кардио- и цереброваскулярных систем, предупреждением нарушений ночного сна и эмоциональной реактивности, оптимизирующим влиянием гормона на гемостаз и иммунный статус [22]. Показана способность данного гормона ослаблять поведенческие и морфологические нарушения у крыс, перенесших черепно-мозговую травму [23]. Мелатонин уменьшает последствия ишемии головного мозга у грызунов, ограничивая отек мозга и зону инсульта, с одновременным снижением масштабов клеточной дегенерации в неокортексе, гиппокампе, полосатом теле [24]. Кроме того, гормон вносит весьма существенный вклад в ни-

величение глутаматной нейротоксичности [25]. Определенную роль в нейропротекции играют антиапоптозные свойства мелатонина, связанные с повышением экспрессии в нервной ткани белков-ингибиторов апоптоза из семейства Bcl-2, а также с подавлением активности ключевых для реализации апоптоза ферментов из семейства каспаз [25].

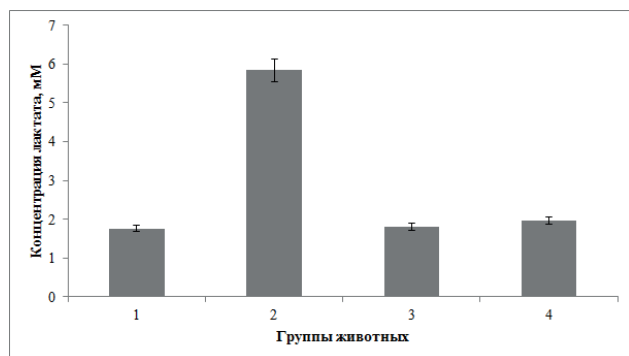


Рис. 1. Содержание лактата в гомогенате мозга ложнопериорированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), животных, получавших на фоне патологии инъекции мелаксена (3), а также крыс, которым на фоне ишемии/реперфузии вводили эпифамин.

Развитие ИРГМ у крыс способствовало угнетению активности АГ, что было сопряжено, по-видимому, с индукцией ОС и повреждением молекулы фермента АФК [26]. Использование тестируемых препаратов приводило к изменению данного показателя в направлении контрольных значений. Так, активность АГ, выраженная в Е/мл сыворотки крови, возрастала на фоне введения мелаксена в 2.0 раза, при введении эпифамина – в 1.9 раза относительно животных с патологией. Активность фермента в мозге крыс, выраженная в Е/г сырой массы ткани, увеличивалась в данных условиях соответственно в 2.3 и

1.5 раза (рис. 2). Сходная тенденция наблюдалась и для удельной активности АГ, возраставшей в сыворотке крови крыс на фоне применения мелаксена и эпифамина в 4.7 и 3.5 раза, а в мозге животных – в 2.0 и 1.3 раза соответственно, по сравнению с показателями второй группы (см. рис. 2). По-видимому, наблюдаемые изменения активности фермента были обусловлены снижением интенсивности свободнорадикального окисления под действием мелатонина, уровень которого подвергался коррекции вводимыми препаратами – мелаксеном и эпифамином. Известно, что гормон мелатонин обладает антиоксидантным потенциалом. Показана способность молекулы гормона непосредственно нейтрализовать свободные радикалы, такие как гидроксильный, супероксид-анион радикал, пероксиды липидов [27]. Опосредованное антиоксидантное действие мелатонина обусловлено его позитивной регулирующей активностью по отношению к таким защитным ферментам, как глутатионпероксидаза, Cu, Zn- и Mn-супероксиддисмутаза, γ-глутамилцистеинлигаза [27]. Вместе с тем, показана способность гормона ингибировать ряд прооксидантных ферментов – 5- и 12-липоксигеназы и NO-синтазы [27], которые под действием ОС в условиях ишемии/реперфузии могут переключаться с генерирования NO на образование кислородных радикалов [28]. В ряде исследований продемонстрировано взаимодействие мелатонина с низкомолекулярными антиоксидантами, усиливающее действие последних [29].

Снижение активности АГ у крыс с ИРГМ было сопряжено с накоплением цитрата – субстрата ферментативной реакции, катализируемой аконитазой. Введение мелаксена и эпифамина при этом способствовало изменению концентрации

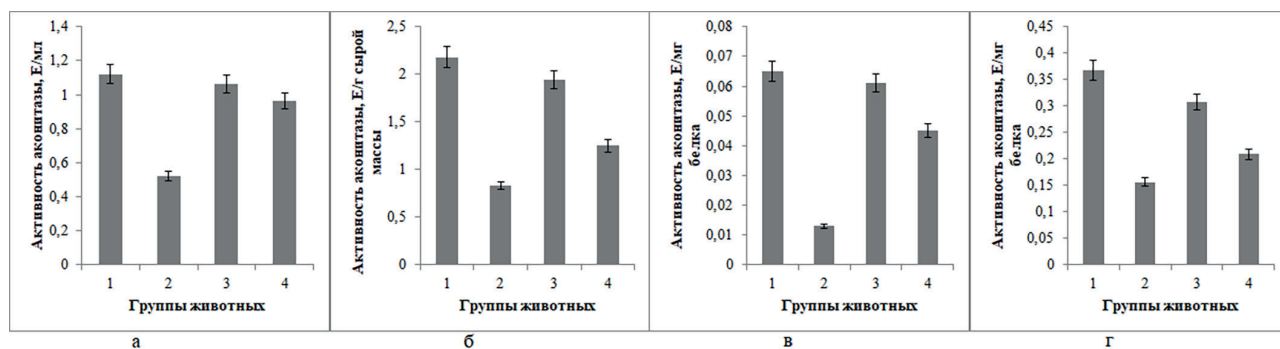


Рис. 2. Активность аконитатгидратазы, представленная в виде Е/мл сыворотки крови (а), Е/г сырой массы ткани мозга (б), а также в виде Е/мг белка в сыворотке крови (в) и мозге (г) ложнопериорированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), животных, которым на фоне патологии вводили мелаксен (3) и эпифамин (4).

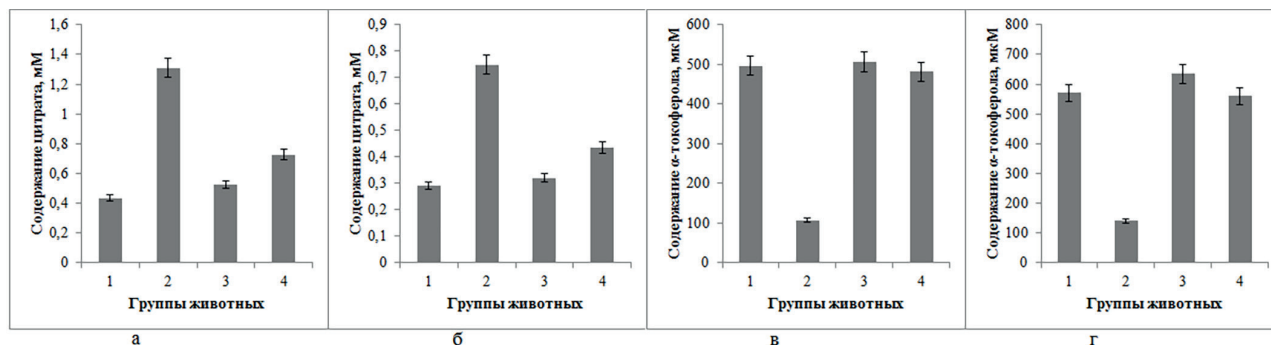


Рис. 3. Содержание цитрата в сыворотке крови (а) и мозге (б), а также концентрация  $\alpha$ -токоферола в сыворотке крови (в) и мозге (г) ложнооперированных животных (1), крыс с ишемией/реперфузией головного мозга (2), животных, которым на фоне патологии вводили мелаксен (3) и эпифамин (4).

данного метаболита в направлении показателей ложнооперированных животных. В сыворотке содержание цитрата снижалось соответственно в 2.5 и 1.8 раза, а в мозге крыс – в 2.3 и 1.7 раза относительно значений у животных с патологией (рис. 3 а, б). Наблюдаемые изменения, вероятнее всего, являлись следствием позитивного влияния мелатонин-корректирующих препаратов на активность АГ, молекулы которой могли подвергаться деструкции под действием АФК при ИРГМ.

В ходе проведения исследования было обнаружено, что мелатонин-корректирующие препараты увеличивают в тканях крыс концентрацию  $\alpha$ -токоферола, существенно расходующегося в условиях развития ОС на фоне ИРГМ. Введение как мелаксена, так и эпифамина способствовало возрастанию содержания данного антиоксиданта в сыворотке крови и мозге крыс фактически до показателей животных первой экспериментальной группы (рис. 3 в, г). По-видимому, выявленные изменения концентрации  $\alpha$ -токоферола обуславливались антиоксидантной активностью и позитивным воздействием на состояние неферментативной АОС мелатонина, уровень которого в организме животных подвергался коррекции тестируемыми препаратами.

Таким образом, введение мелатонин-корректирующих препаратов на фоне развития ИРГМ у крыс способствовало сдвигу показателей, характеризующих развитие окислительного стресса, в направлении контрольных значений. Показанные изменения, по-видимому, были обусловлены коррекцией уровня мелатонина, обладающего как прямым, так и опосредованным антиоксидантным действием.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как показали проведенные эксперименты, ана-

лизируемые мелатонин-корректирующие препараты способствовали возрастанию в тканях животных активности АГ и содержания  $\alpha$ -токоферола, снижавшихся при развитии ИРГМ, а также уменьшению концентрации накапливающегося в условиях моделирования патологии цитрата. Более существенное позитивное влияние на исследуемые показатели оказывал мелаксен, содержащий мелатонин, который, по-видимому, быстрее включался в метаболические процессы и проявлял антиоксидантный и протекторный эффект. Несколько менее эффективное действие эпифамина, в свою очередь, могло быть обусловлено опосредованным влиянием данного препарата на метаболизм мелатонина через эпителио-эпифизарную область мозга.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Block F. // Prog. Neurobiol. 1999. №58. pp. 279–295.
2. Гусев Е. И., Скворцов В.И. Ишемия головного мозга. Москва, Медицина, 2001, 328 с.
3. Zhao H., Sapolsky R.M., Steinberg G.K. // J Cereb Blood Flow Metab. 2006. V. 26, N. 9, pp. 1114–1121.
4. Graham D.I., Lantos P.L. Greenfield's Neuropathology. London, Arnold, 1997, 2288 p.
5. de Vries D.K., Kortekaas K.A., Tsikas D., Wijermars L.G., van Noorden C.J., Suchy M.T., Cobbaert C.M., Klautz R.J., Schaapherder A.F., Lindeman J.H. // Antioxidants & Redox Signaling. 2013. V. 19, N. 6, pp. 535–545.
6. Heeba G.H., El-Hanafy A.A. // Life Sciences. 2012. V. 90, N. 11–12, pp. 388–395.
7. Yang Y., Duan W., Lin Y., Yi W., Liang Z., Yan J., Wang N., Deng C., Zhang S., Li Y., Chen W., Yu S., Yi D., Jin Z. // Free Radical Biology & Medicine. 2013. V. 65, pp. 667–679.
8. Yaylak F., Canbaz H., Caglikulekci M., Dirlik M., Tamer L., Ogetman Z., Polat Y., Kanik A., Aydin

- S. // Journal of Surgical Research. 2008. V. 148, N. 2, pp. 214–223.
9. Khastar H., Kadkhodae M., Sadeghipour H.R., Seifi B., Hadjati J., Najafi A., Soleimani M. // Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2011. V. 14, N. 6, pp. 534–539.
10. Yellon D.M., Hausenloy D.J. // N Engl J Med. 2007. V. 357, N. 11, pp. 1121–1135.
11. Douzinas E.E., Livaditi O., Andrianakis I., Prigouris P., Paneris P., Villiotou V., Betrosian A.P. // Intensive Care Med. 2008. V. 34, N. 6, pp. 1133–1141.
12. Gille L., Rosenau T., Kozlov A.V., Gregor W. // Biochem Pharmacol. 2008. V. 76, N. 3, pp. 289–302.
13. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. // Успехи биол. химии. 2009. Т. 49, С. 341–388.
14. Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н., Золоедов В.И., Семенихина А.В., Рахманова Т.И. // Биомедицинская химия. 2008. Т. 54, вып. 1, С. 114–121.
15. Попов С.С., Пашков А.Н., Агарков А.А., Шульгин К.К. // Биомедицинская химия. 2008. Т. 61, вып. 3, С. 400–406.
16. Бульон В.В., Хныченко Л.К., Сапронов Н.С., Коваленко А.Л., Алексеева Л.Е. // Бюлл. экпер. биол. и мед. 2000. Т. 120, № 2, С. 149–151.
17. Сафонова О.А., Попова Т.Н., Макеева А.В., Панченко Л.Ф. // Нейрохимия. 2009. Т. 26, № 4, С. 328–332.
18. Desai I.D., Martinez F.E. // Clin Chim Acta. 1986. V. 154, N. 3, pp. 247–250.
19. Ллойд Э. Справочник по прикладной статистике. Москва, Финансы и статистика, 1990, 525 с.
20. Попова Т.Н., Сафонова О.А., Столярова А.О. // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62, вып. 5, С. 561–565.
21. Нечипуренко Н.И., Василевская Л.А., Грибоедова Т.В., Щербина Н.Ю., Мусяенко Ю.И. // Бюлл. экпер. биол. и мед. 2006. Приложение 1, С. 224–229.
22. Yolanda E, Soriento E. Melatonin, sleep and insomnia: Endocrinology research and clinical developments. New York, Nova Biomedical Books, 2010, 397 p.
23. Арушанян Э.Б., Наумов С.С., Пономарёва В.А. // Эксп. и клин. фарм. 2009. Т. 72, № 5, С. 18–21.
24. Claustrat B., Brun J., Chazot G. // Sleep Med Rev. 2005. Vol. 9, pp. 11–24.
25. Hardeland R., Roeggeler B. // Open Physiol J. 2008. Vol. 1, pp. 1–23.
26. Макеева А.В., Попова Т.Н., Сливкин А.И., Крыльский Д.В. // Биомедицинская химия. 2009. Т. 55, вып. 5, С. 643–650.
27. Беспярых А.Ю., Бурлакова О.В., Голиченков В.А. // Успехи современной биологии. 2010. Т. 130, № 5, С. 487–496.
28. Dong W., Li F., Pan Z., Liu S., Yu H., Wang X., Bi S., Zhang W. // Journal of Surgical Research. 2013. V. 185, N. 1, pp. 182–189.
29. Tan D.X., Reiter R.J., Manchester L.C., Yan M.T., El-Sawi M., Sainz R.M., Mayo J.C., Kohen R., Allegra M., Hardeland R. // Curr. Top. Med. Chem. 2002. V. 2, pp. 181–197.

*Воронежский государственный университет  
Столярова А. О., аспирант кафедры медицин-  
ской биохимии и микробиологии  
Тел.: +7 903 858-11-61  
E-mail: stolyarova-anna@yandex.ru*

*Сафонова О. А., кандидат биологических  
наук, доцент кафедры медицинской биохимии и  
микробиологии  
Тел.: +7 (473) 220-75-21 (1111)  
E-mail: solya333@mail.ru*

*Крыльский Е. Д., кандидат биологических  
наук, ассистент кафедры медицинской биохимии  
и микробиологии  
Тел.: +7 952 549-37-96  
E-mail: evgenij.krylsky@yandex.ru*

*Voronezh State University  
Stolyarova A O., Postgraduate student of the  
Medical Biochemistry and Microbiology Department  
Ph.: +7 903 858 11 61  
E-mail: stolyarova-anna@yandex.ru*

*Safonova O. A., Ph.D. (Biology), associate  
professor of Medical Biochemistry and Microbiology  
Department  
Ph.: +7 (473) 220-75-21 (1111)  
E-mail: solya333@mail.ru*

*Kryl'skiy E. D., Ph.D. (Biology), Assistant of the  
Medical Biochemistry and Microbiology Department  
E-mail: evgenij.krylsky@yandex.ru  
Ph.: +7 952 549-37-96*

Столярова А. О., Попова Т. Н., Сафонова О. А., Крыльский Е. Д., Кириченко Л. А., Крутаков Р. С.

Попова Т. Н., доктор биологических наук, заведующий кафедрой медицинской биохимии и микробиологии

Тел.: +7 (473) 220-75-21 (1110)

E-mail: biomed-popova@yandex.ru

Popova T. N., Ph.D. (Biology), D.Sci. (Biology), Full Professor, head of the Medical Biochemistry and Microbiology Department

Ph.: +7 (473) 220-75-21 (1110)

E-mail: biomed-popova@yandex.ru

Кириченко Л. А., студент кафедры медицинской биохимии и микробиологии

Тел.: +7 909 212-25-77

E-mail: kirichencko.liudm@yandex.ru

Kirichenko L. A., Student of the Medical Biochemistry and Microbiology Department

Ph.: +7 909 212-25-77

E-mail: kirichencko.liudm@yandex.ru

Крутаков Роман Сергеевич, студент кафедры медицинской биохимии и микробиологии

Тел.: +7 980 344 97 58

E-mail: ignelliar@gmail.com

Krutakov Roman S., Student of the Medical Biochemistry and Microbiology Department

Ph.: +7 980 344-97-58

E-mail: ignelliar@gmail.com

## THE EFFECT OF MELATONIN-CORRECTING DRUGS ON THE ACONITATE HYDRATASE ACTIVITY AND NON-ENZYMATIC ANTIOXIDANTS CONTENT UNDER CEREBRAL ISCHEMIA-REPERFUSION IN RATS

T. N. Popova, O. A. Safonova, E. D. Kryl'skiy A. O. Stolyarova, L. A. Kirichenko, R. S. Krutakov

*Voronezh State University*

**Abstract.** the most acute problems of modern biomedicine include disorders of cerebral circulation. Oxidative stress is one of the key non-specific pathogenetic factors of them. However, in the course of such disorders development an organism antioxidative protective system reserves may not be sufficient. That's why studies of biologically active substances having antioxidant activity are appropriate. Among such substances the hormone melatonin is of great interest. The aim of the work was to assess the impact of melatonin-corrective agents – melaxen and epiphamin, on the aconitate hydratase activity, which is a critical target for free radicals action, citrate and  $\alpha$ -tocopherol content in the brain and blood serum of experimental rats with cerebral ischemia / reperfusion. White laboratory male rats were used as research object. Cerebral ischemia / reperfusion was modeled under anesthesia by 30 minute occlusion of the common carotid arteries and subsequent clamp removal. The lactate content was assessed by diagnostic kit of Vital (Russia) use. The aconitate hydratase activity was determined spectrophotometrically at 235 nm. The citrate concentration was determined by the Nathelson method, the  $\alpha$ -tocopherol level was evaluated by the formation of the complex compound with  $Fe^{2+}$  and orthophenanthroline. As the results of the research, the introduction of melaxen and epiphamin contributed to aconitate hydratase activity increase in the rats brain in 2.3 and 1.5 times, and serum – in 2.0 and 1.9 times relatively to rates of animals with the pathology. In these conditions the increase in enzyme activity caused a decrease in the citrate content in the brain and blood serum. The concentration of this substance decreased under the introduction of melaxen in 2.5 and 1.8 times, epiphamine – in 2.3 and 1.7 times respectively. In addition, the use of melatonin-correcting drugs led to a normalization of the  $\alpha$ -tocopherol concentration, which decreased under the pathology. Observed changes apparently were associated with the ability of tested drugs to maintain an optimal level of melatonin exerting a neuroprotective and antioxidant effect as well as capable of providing a positive regulatory effect on non-enzymatic antioxidant system.

**Keywords:** melatonin, ischemia / reperfusion, oxidative stress, aconitate hydratase, citrate,  $\alpha$ -tocopherol.

### REFERENCES

1. Block F., Prog. Neurobiol., 1999., №58., pp. 279–295. DOI: 10.1016/S0301-0082(98)00085-9. Available at: sciencedirect.com (accessed 22.06.2018).

2. Gusev E.I., Skvortsov V.I. Brain ischemia. Moscow, Medicine, 2001, 328 p.

3. Zhao H., Sapolsky R.M., Steinberg G.K., J Cereb Blood Flow Metab., 2006., V. 26, N. 9, pp. 1114-1121. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600348.

Available at: journals.sagepub.com (accessed 22.06.2018).

4. Graham D.I., Lantos P.L. *Greenfield's Neuropathology*. London, Arnold, 1997, 2288 p.

5. de Vries D.K., Kortekaas K.A., Tsikas D., Wijermars L.G., van Noorden C.J., Suchy M.T., Cobbaert C.M., Klautz R.J., Schaapherder A.F., Lindeman J.H., *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013., V. 19, N. 6, pp. 535–545. DOI: 10.1089/ars.2012.4580. Available at: ncbi.nlm.nih.gov (accessed 22.06.2018).

6. Heeba G.H., El-Hanafy A.A., *Life Sciences*, 2012., V. 90, N. 11-12, pp. 388–395. DOI: 10.1016/j.lfs.2011.12.001. Available at: sciencedirect.com (accessed 22.06.2018).

7. Yang Y., Duan W., Lin Y., Yi W., Liang Z., Yan J., Wang N., Deng C., Zhang S., Li Y., Chen W., Yu S., Yi D., Jin Z., *Free Radical Biology & Medicine*, 2013., V. 65, pp. 667–679. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.007. Available at: sciencedirect.com (accessed 22.06.2018).

8. Yaylak F., Canbaz H., Caglikulekci M., Dirlik M., Tamer L., Ogetman Z., Polat Y., Kanik A., Aydin S., *Journal of Surgical Research*, 2008., V. 148, N. 2, pp. 214–223. DOI: 10.1016/j.jss.2007.10.008. Available at: journalofsurgicalresearch.com (accessed 22.06.2018).

9. Khastar H., Kadkhodae M., Sadeghipour H.R., Seifi B., Hadjati J., Najafi A., Soleimani M., *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2011., V. 14, N. 6, pp. 534–539. Available at: ncbi.nlm.nih.gov (accessed 22.06.2018).

10. Yellon D.M., Hausenloy D.J., *N Engl J Med*, 2007., V. 357, N. 11, pp. 1121–1135. DOI: 10.1056/NEJMra071667. Available at: nejm.org (accessed 22.06.2018).

11. Douzinas E.E., Livaditi O., Andrianakis I., Prigouris P., Paneris P., Villiotou V., Betrosian A.P., *Intensive Care Med*, 2008., V. 34, N. 6, pp. 1133–1141. DOI: 10.1007/s00134-007-0940-4. Available at: link.springer.com (accessed 22.06.2018).

12. Gille L., Rosenau T., Kozlov A.V., Gregor W., *Biochem Pharmacol*, 2008., V. 76, N. 3, pp. 289–302. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.04.003. Available at: sciencedirect.com (accessed 22.06.2018).

13. Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., *Advances in Biological Chemistry*, 2009, Vol. 49, pp. 341–388.

14. Popov S.S., Pashkov A.N., Popova T.N., Zolodov V.I., Semenikhina A.V., Rakhmanova T.I., *Biomedical chemistry*, 2008, Vol. 54, no. 1, pp. 114–121.

15. Popov S.S., Pashkov A.N., Agarkov A.A., Shulgin K.K., *Biomedical chemistry*, 2008, Vol. 61, no. 3, pp. 400–406.

16. Bulyon V.V., Khnychenko L.K., Sapronov N.S., Kovalenko A.L., Alekseeva L.E., *Bull. exp. biol. and med.*, 2000, V. 120, no. 2, pp. 149–151.

17. Safonova O.A., Popova T.N., Makeeva A.V., Panchenko L.F., *Neurochemistry*, 2009, Vol. 26, no. 4, pp. 328–332.

18. Desai I.D., Martinez F.E., *Clin Chim Acta*, 1986, V. 154, N. 3, pp. 247–250. DOI: 10.1016/S0022-3476(81)80465-9. Available at: sciencedirect.com (accessed 22.06.2018).

19. Lloyd E. *Handbook of Applied Statistics*. Moscow, Finance and Statistics, 1990, 525 p.

20. Popova T.N., Safonova O.A., Stolyarova A.O., *Biomedical Chemistry*, 2016, Vol. 62, no. 5, pp. 561–565.

21. Nechipurenko N.I., Vasilevskaya L.A., Griboedova T.V., Shcherbina N.Yu., Musienko Yu.I., *Bull. exp. biol. and med.*, 2006, App. 1, pp. 224–229.

22. Yolanda E, Soriento E. *Melatonin, sleep and insomnia: Endocrinology research and clinical developments*. New York, Nova Biomedical Books, 2010, 397 p.

23. Arushanyan E.B., Naumov S.S., Ponomareva V.A., *Exp. and Clinical Pharm.*, 2009, Vol. 72, No. 5, pp. 18–21.

24. Claustrat B., Brun J., Chazot G., *Sleep Med Rev.*, 2005, Vol. 9, pp. 11–24. DOI: 10.1016/j.smr.2004.08.001. Available at: sciencedirect.com (accessed 22.06.2018).

25. Hardeland R., Poeggeler B., *Open Physiol J.*, 2008, Vol. 1, pp. 1–23. DOI: 10.2174/1874360900901010001. Available at: benthamopen.com (accessed 22.06.2018).

26. Makeeva A.V., Popova T.N., Slivkin A.I., Krylsky D.V., *Biomedical Chemistry*, 2009, Vol. 55, no. 5, pp. 643–650.

27. Bespyatykh A.Yu., Burlakova O.V., Golichenkov V.A., *Advances in modern biology*, 2010, V. 130, No. 5, pp. 487–496.

28. Dong W., Li F., Pan Z., Liu S., Yu H., Wang X., Bi S., Zhang W., *Journal of Surgical Research*, 2013, V. 185, N. 1, pp. 182–189. DOI: doi.org/10.1016/j.jss.2013.05.013. Available at: sciencedirect.com (accessed 22.06.2018).

29. Tan D.X., Reiter R.J., Manchester L.C., Yan M.T., El-Sawi M., Sainz R.M., Mayo J.C., Kohen R., Allegra M., Hardeland R., *Curr. Top. Med. Chem.*, 2002, V. 2, pp. 181–197. DOI: 10.2174/1568026023394443. Available at: ingentaconnect.com (accessed 22.06.2018).