

На правах рукописи

Синицына Дарья Андреевна

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ДИГИДРОХИНОЛИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА
ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ
ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ У КРЫС**

1.5.4. Биохимия

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва 2024

Работа выполнена на кафедре медицинской биохимии и микробиологии медико-биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет»

Научный руководитель

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

Официальные оппоненты:

Нестеров Семён Валерьевич,

кандидат биологических наук, научный
сотрудник лаборатории молекулярной
биоэнергетики ФГБУ «Национальный
исследовательский центр «Курчатовский
институт»;

Белослудцев Константин Николаевич,

доктор биологических наук, проректор по
инновационной деятельности, профессор
кафедры биохимии, клеточной биологии и
микробиологии ФГБОУ ВО «Марийский
государственный университет».

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Московский государственный
университет имени М. В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится 6 июня 2024 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание учёной степени доктора наук, на соискание учёной степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва Ленинский проспект, д. 33 строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33 строение 1 и на сайте <https://www.fbras.ru> и в зональной научной библиотеке ФГБОУ ВО Воронежского государственного университета по адресу: 394036 г. Воронеж, пр. Революции, 24.

Автореферат разослан «__» __ ____ года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
24.1.233.01,
кандидат биологических наук

Орловский А.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. За последнее десятилетие были предприняты значительные усилия по борьбе с заболеваниями печени, но, несмотря на это, они остаются одной из острых проблем биомедицины [1], занимая второе место среди причин смерти от желудочно-кишечных заболеваний после колоректального рака [2]. Как известно, печень является центральным органом в метаболизме поступающих в организм лекарств и других химических соединений. Злоупотребление алкоголем, приём наркотических средств, вирусные инфекции и использование ряда лекарственных средств могут вызвать повреждение печени, причем гепатотоксичность является наиболее часто встречающимся побочным эффектом лекарственных препаратов, приводящем к их отмене [3].

Ксенобиотики, в частности, такие промышленные поллютанты, как тетрахлорметан (CCl₄), метаболизируются в печени с образованием чрезмерного количества свободных радикалов, которые окисляют широкий ряд клеточных макромолекул различных классов, вызывая окислительный стресс [4]. Защиту печени от окислительного стресса осуществляет антиоксидантная система (АОС) [5]. Значимую роль в её регуляции играют редокс-чувствительные транскрипционные факторы, одним из важнейших среди которых является Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2), способный активировать ARE (antioxidant response element)-содержащие гены антиоксидантов и ферментов метаболизма ксенобиотиков [6].

Активизация свободнорадикального окисления, вызванная ксенобиотиками, сопровождается синтезом провоспалительных цитокинов и развитием воспалительной реакции [7], контроль которой осуществляет ядерный транскрипционный фактор карпа В (NF-κB) [8]. Регулятором воспалительного ответа выступает также NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3)-инфламасома, обеспечивающая созревание каспазы-1 и интерлейкина-1β, который, в свою очередь, индуцирует синтез остальных провоспалительных интерлейкинов [9]. Кроме этого, образующиеся в печени при трансформации ксенобиотиков активные формы кислорода (АФК) могут вызывать апоптоз митохондриально-зависимыми и внешними путями, который сопровождается активацией каспаз, нуклеаз, расщеплением клеточных белков и конденсацией хроматина [10].

Ключевым вопросом в защите от токсического воздействия ксенобиотиков на клетки печени является поиск наиболее эффективных гепатопротекторных средств. Несмотря на большое количество существующих гепатопротекторов, все они имеют ряд недостатков, включая низкую биодоступность, необходимость длительного приёма, побочные реакции со стороны желудочно-кишечного тракта, прооксидантный эффект и другие [11]. Интерес с точки зрения наличия гепатопротекторной активности вызывают дигидрохинолиновые производные, к которым, в частности, относится этоксихин (6-этокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин), обладающий противоопухолевым [12] и антиоксидантным действием [13].

Тем не менее, вследствие способности этоксихина проявлять ряд негативных эффектов [14], его применение в качестве гепатопротектора для людей оказалось нецелесообразным. В ходе проведённого нами анализа *in silico* было обнаружено, что среди производных дигидрохинолина существуют более перспективные соединения-кандидаты в предшественники лекарственных средств с наиболее высокой антиоксидантной и гепатопротекторной активностью. Так, нами был отобран и протестирован в качестве гепатопротектора при CCl₄-индуцированном поражении печени 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин (ДГХ1). В ходе настоящей работы мы исследовали также аналог ДГХ1 – 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин (ДГХ2), полученный путём введения бензоильной группы к атому азота гидрохинолинового цикла, что должно повысить безопасность соединения посредством блокирования его участия в реакциях образования токсичных метаболитов. Таким образом, нами был проведен анализ гепатопротекторного потенциала ДГХ1 и ДГХ2, а также оценено воздействие данных

соединений на основные патогенетические механизмы токсического поражения печени (ТПП) у крыс, вызванного введением CCl_4 .

Целью настоящей работы являлось исследование воздействия ДГХ1 и ДГХ2 на маркерные показатели повреждения гепатоцитов, интенсивность свободнорадикальных, воспалительных и апоптотических процессов, а также регуляцию функционирования АОС при CCl_4 -индуцированном ТПП у крыс.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Прогнозирование биологической активности дигидрохинолиновых производных, оценка их воздействия на маркерные показатели цитолиза гепатоцитов у крыс с индуцированным ТПП, а также гистологическое исследование морфологии ткани печени у животных при развитии патологии и введении тестируемых соединений.

2. Анализ активности процессов свободнорадикального окисления на фоне введения ДГХ1 и ДГХ2 крысам с экспериментальным ТПП.

3. Анализ интенсивности воспалительных процессов и их NLRP3-опосредованной регуляции при ТПП и введении дигидрохинолиновых производных.

4. Оценка активности апоптотических процессов в печени крыс, получавших тестируемые соединения на фоне ТПП.

5. Исследование активности и некоторых свойств ферментов АОС, концентрации неферментативных антиоксидантов, а также активности основных ферментов-поставщиков НАДФН для восстановления окисленного глутатиона у крыс при развитии ТПП и введении дигидрохинолиновых производных.

6. Анализ уровня мРНК генов антиоксидантных ферментов, а также факторов транскрипции Nrf2 и FOXO1 (forkhead box O1) в печени животных с патологией, подвергнутых введению ДГХ1 и ДГХ2.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Введение ДГХ1 и ДГХ2 крысам с CCl_4 -индуцированным ТПП приводило к снижению активности маркерных ферментов цитолиза гепатоцитов и нормализации морфологии ткани печени, что свидетельствует о наличии у тестируемых соединений гепатопротекторных свойств.

2. Анализ показателей интенсивности свободнорадикальных и апоптотических процессов, а также исследование активности воспалительного ответа и его NLRP3-опосредованной регуляции продемонстрировали, что в основе гепатопротекторного эффекта ДГХ1 и ДГХ2 лежат антиокислительные и противовоспалительные свойства данных соединений.

3. Антиокислительный эффект ДГХ1 и ДГХ2 был обусловлен их способностью регулировать функционирование АОС, выразившейся в изменении активности антиоксидантных ферментов, уровня мРНК их генов и транскрипционных факторов Nrf2 и FOXO1, а также концентрации неферментативных антиоксидантов у крыс с ТПП.

Научная новизна. Впервые проведено исследование воздействия ДГХ1 и ДГХ2 на маркерные показатели цитолиза гепатоцитов и морфологию ткани печени, интенсивность процессов свободнорадикального окисления, апоптоза, воспалительного ответа и NLRP3-опосредованную сигнальную трансдукцию, транскрипционную регуляцию функционирования АОС и активность НАДФН-генерирующих ферментов при экспериментальном ТПП у крыс.

Продemonстрировано снижение интенсивности свободнорадикального окисления в печени и сыворотке крови крыс с индуцированным ТПП под действием тестируемых дигидрохинолиновых производных. Было установлено, что уменьшение активности свободнорадикальных процессов под действием протекторов сопровождалось торможением воспалительного ответа, степени активации NLRP3-инфламмосомы, каспазы-1 и интерлейкина 1β , а также смягчением выраженности апоптоза. Выявлено позитивное воздействие дигидрохинолиновых производных на функционирование АОС при ТПП, выражающееся в изменении показателей активности антиоксидантных ферментов, уровня

мРНК их генов и концентрации неферментативных антиоксидантов в направлении контрольных значений. Для ДГХ2 была также показана способность индуцировать транскрипцию ряда генов антиоксидантных ферментов, что могло вносить вклад в снижение уровня окислительного стресса у животных с патологией. Установлено, что ДГХ1 и ДГХ2 проявляют более выраженную по сравнению с использовавшимся в качестве препарата сравнения карсиллом гепатопротекторную, антиокислительную и противовоспалительную активность, а также способность регулировать антиоксидантный ответ в условиях оксидативного стресса.

Практическая значимость. Результаты исследования способствуют углублению представлений о возможности регуляции механизмов патогенеза поражений печени токсического характера. Полученные данные также вносят вклад в понимание путей коррекции воспалительных, апоптотических процессов и антиоксидантного ответа при окислительном стрессе и действии веществ-протекторов дигидрохинолинового ряда. Полученные данные о гепатопротекторной активности ДГХ1 и ДГХ2 могут служить базой для создания новых терапевтических средств, направленных на лечение и профилактику острых поражений печени. Используемые в ходе выполнения данной работы подходы могут также представлять интерес для клинической лабораторной диагностики в качестве методов мониторинга показателей состояния оксидативного статуса при патологиях печени и проведении их лечения.

Результаты работы применяются в учебном процессе на медико-биологическом и фармацевтическом факультетах Воронежского государственного университета. В частности, материалы работы используются при чтении таких курсов, как «Биологическая химия», «Свободнорадикальные процессы в биосистемах», «Интеграция обменных процессов в организме», «Ферментативная регуляция и контроль генной активности», «Патобиохимия» и других. Материалы работы используются также при проведении спецпрактикумов, выполнении студентами курсовых и выпускных квалификационных работ.

Методология и методы диссертационного исследования. В ходе выполнения работы использовались современные биохимические, молекулярно-биологические методы.

Достоверность полученных результатов. Выводы по результатам работы и научные положения, выдвигаемые на защиту, основаны на экспериментальных данных, полученных с применением адекватных методов физико-химической и молекулярной биологии и математического анализа, а также проанализированных с привлечением теоретической базы, представленной в современной научной литературе. Таким образом, результаты исследования являются статистически значимыми и воспроизводимыми.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на 7-й международной научно-методической конференции «Фармобразование-2018» (Воронеж, 2018); международной научно-практической конференции «Научные исследования в современном мире: опыт, проблемы и перспективы развития» (Уфа, 2019); международной научно-практической конференции «Инновационные научные исследования: теория, методология, тенденции развития» (Уфа, 2019); международной научной конференции «Технические и естественные науки» (Санкт-Петербург, 2020); международной научной конференции «Science. Research. Practice» (Санкт-Петербург, 2020); международной научной конференции «Высокие технологии и инновации в науке» (Санкт-Петербург, 2021).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие во всех этапах исследования, включая сбор и анализ литературных данных, планирование и проведение экспериментов, интерпретацию полученных результатов и их оформление. Подготовка основных публикаций по теме диссертации проводилась совместно с соавторами и научным руководителем автора.

Публикации. Основные результаты работы изложены в 16 публикациях, из них 5 – в отечественных и зарубежных научных изданиях, входящих в перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 174 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов (5 глав), заключения, выводов, списка литературы (216 источника). Иллюстративный материал включает 7 таблиц и 24 рисунка, а также 1 таблицу и 8 рисунков в Приложении.

Список сокращений.

АГ – аконитатгидратаза; АлАТ – аланинаминотрансфераза; АОС – антиоксидантная система; АсАТ – аспаратаминотрансфераза; АФК – активные формы кислорода; БХЛ – бихемилюминесценция; Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза; ГП – глутатионпероксидаза; ГР – глутатионредуктаза; ГТ – глутатионтрансфераза; ДГХ1 – 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин; ДГХ2 – 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин; ДК – диеновые конъюгаты; ИДГ – изоцитратдегидрогеназа; ЛД – летальная доза; МПО – миелопероксидаза; НАД – никотинамидадениндинуклеотид; НАДФ – никотинамидадениндинуклеотид фосфат; ОМБ – окислительная модификация белков; ОС – окислительный стресс; ПОЛ – пероксидное окисление липидов; СОД – супероксиддисмутаза; ТПП – токсическое поражение печени; ФАД – флавинадениндинуклеотид; ЭДТА – этилендиаминтетраацетат; АИФ – фактор, индуцирующий апоптоз; ARE – antioxidant response element, элементы антиоксидантного ответа; СОХ2 – циклооксигеназа-2; FOXO – forkhead box protein O; GSH – глутатион восстановленный; GSSG – глутатион окисленный; ИЛ – интерлейкины; I_{max} – максимальная вспышка бихемилюминесценции; NF-κB – ядерный транскрипционный фактор, усилитель каппа-легкой цепи активированных В-клеток; NLRP3 – NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3; Nrf2 – ядерный транскрипционный фактор эритроидного происхождения; S – светосумма бихемилюминесценции; tgα2 – тангенс угла наклона касательной к кривой бихемилюминесценции; TNF-α – фактор некроза опухоли α.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект и материалы исследования. В качестве объекта исследования выступали крысы-самцы Wistar возрастом 4-6 месяцев и массой 200-250 г, содержащиеся при комнатной температуре, 12-часовом световом дне и доступе к воде и пище *ad libitum*.

В ходе эксперимента животных разделили на 9 групп: контрольные животные (n=12), получавшие внутривентрикулярно вазелиновое масло; контрольные животные, подвергнутые введению ДГХ1 (n=10) и ДГХ2 (n=10) в дозе 50 мг/кг веса; крысы с повреждением печени, индуцированным однократным введением *per os* с помощью зонда четыреххлористого углерода в дозировке 0,064 мл на 100 г веса животного (n=12); крысы с ТПП, получавшие в качестве гепатопротектора ДГХ1 в дозе 25 мг/кг (n=12) и 50 мг/кг (n=12) веса; животные, которым на фоне патологии вводили ДГХ2 в дозе 25 мг/кг (n=12) и 50 мг/кг (n=12) веса; животные с ТПП, получавшие внутривентрикулярно карсил в дозе 50 мг/кг веса (n=12);

ДГХ1, ДГХ2 и карсил животным вводили один раз в сутки в течение трёх дней, начиная через 3 часа после администрации СС₁₄ или вазелинового масла. На 4 день эксперимента у наркотизированных животных производили забор крови и печени.

Подготовка материала для исследования. Перед извлечением печени из брюшной полости, ее перфузировали *in situ* ледяным 0,9% раствором NaCl через портальную вену. Далее, с помощью гомогенизатора Daihan HG-15A ткань гомогенизировали в трехкратном объеме охлажденной среды выделения, состоявшей из раствора 50 мМ трис-HCl-буфера, pH 7,6, 10 мМ ЭДТА и 2 мМ β-меркаптоэтанола. Затем гомогенат центрифугировали в течение 12 минут при 7000 g. После удаления осадка супернатант использовали в исследованиях. Венозную кровь собирали в стеклянные пробирки без добавления

антикоагулянта и помещали на 30 мин в термостат при температуре 37°C. После инкубации цельную кровь центрифугировали в течение 10 мин при 2000 g для получения сыворотки.

Анализ биологической активности и токсичности соединений. Оценку биологической активности дигидрохинолиновых производных осуществляли с помощью программы Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS). Анализ токсичности соединения осуществляли с помощью анализа *in silico* с использованием программы ProTox-II.

Измерение ферментативной активности осуществляли спектрофотометрически используя Hitachi U-1900 с программным обеспечением. Ферментативную активность выражали в виде удельной активности, Е/г сырой массы печени и Е/мл сыворотки. Содержание общего белка измеряли унифицированным биуретовым методом.

Выделение и очистку глутатионпероксидазы осуществляли при температуре 0-4 °С. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 7000 g в течение 10 мин. Для дальнейшей очистки фермента использовали методы высаливания сульфатом аммония, гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 (Fine, Sigma-Aldrich, США) и ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (Whatman, Sigma-Aldrich, США).

Определение содержания компонентов неферментативной антиоксидантной системы. Содержание GSH определяли с помощью метода, основанного на способности 5,5- дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты реагировать с сульфгидрильной группой GSH с образованием в эквимольных количествах тионитрофенильного аниона, имеющего максимум поглощения при 412 нм. Концентрацию цитрата определяли по методу Нательсона (Natelson, S., 1948). Содержание α - токоферола в сыворотке крови определяли фотометрически по реакции с ионами Fe^{2+} и ортофенантролина (Desai I.D., Martinez F.E., 1986).

Оценка оксидативного статуса. Содержание первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов, определяли спектрофотометрически при 233 нм в экстрагированной гептановой фазе липидов. (Стальная И.Д., 1977) Степень окислительной модификации белков анализировали с помощью метода, основанного на взаимодействии карбонильных остатков аминокислот с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов. (Азизова О.А. и др., 2007). Для анализа интенсивности процессов свободнорадикального окисления (СО) использовали метод измерения хемилюминесценции, индуцированной железом и пероксидом водорода, на биохемилюминометре БХЛ-07 с программным обеспечением. Кинетическую кривую БХЛ регистрировали в течение 30 секунд и определяли такие параметры, как интенсивность вспышки (I_{max}) и светосумму (S), характеризующие интенсивность свободнорадикального окисления, и величину тангенса угла наклона кривой ($tg\alpha$), отражающую общую антиоксидантную активность.

Интенсивность апоптотических процессов в тканях экспериментальных животных оценивали по изменению активности каспазы-3 и каспазы-8, используя коммерческие наборы реактивов Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric и Caspase 8 Assay Kit, Colorimetric («BioVision», США) согласно прилагаемым протоколам.

Оценка уровня транскриптов генов. Экстракцию тотальной клеточной РНК осуществляли с помощью реагента «ExtractRNA» (Евроген, Россия) в соответствии с прилагаемым протоколом. Обратная транскрипция осуществлялась с помощью набора «MMLV RT kit» (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией. Применяли смесь праймеров олиго-(4T)15 и Random (dN)10. ПЦР в реальном времени проводили с помощью смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) на приборе CFX Connect (BioRad, США). Расчет относительного уровня мРНК исследуемых генов проводили с помощью $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метода.

Гистологические исследования. Из ткани печени экспериментальных животных после проводки и заливки в парафин готовили срезы толщиной 6 мкм с помощью

ротационного микротомы HM-325 (Thermo Fisher Scientific, США), окрашивали гематоксилином и эозином. Изображения получали с помощью светового микроскопа AxioLab A1 (Zeiss, Германия).

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Фиксированные в формалине и пропитанные парафином ткани печени блокировали с помощью Serum-Free Protein Block (X0909, DAKO), после чего инкубировали с первичными антителами против NLRP3, расщепленной каспазы-1 (Adipogen life sciences, США) и расщепленного IL-1 β (Cell signaling technology, США). После промывки и инкубации с флуоресцентными вторичными антителами, препараты монтировали с помощью ProLongTM Diamond Antifade Mountant (Invitrogen) и просматривали с помощью лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SP5 (Leica, Германия).

Статистическая обработка экспериментальных данных. Опыты повторяли в 10-12-кратных биологических повторностях. Аналитические повторы проводили дважды для каждой пробы. Для проверки гипотезы о соответствии распределения полученных вариантов нормальному распределению использовали критерий Колмогорова-Смирнова в модификации Лиллиефорса. Результаты исследования обрабатывали с использованием показателей описательной статистики. Полученные результаты опытных образцов сравнивали с контролем. На рисунках и в таблицах данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Достоверно различающимися считали значения, для которых $p < 0,05$.

ОЦЕНКА ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА ДИГИДРОХИНОЛИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

1. Поиск дигидрохинолиновых производных с целевой биологической активностью

На начальном этапе работы была проведена оценка биологической активности широкого ряда дигидрохинолиновых производных с помощью программы анализа биологической активности PASS. Среди анализируемых соединений для настоящего исследования был отобран ДГХ1, для которого был предсказан высокий гепатопротекторный и антиокислительный потенциал. Для исследования был выбран также структурный аналог ДГХ1 – ДГХ2, у которого методом введения бензоильной группы к атому азота была заблокирована способность превращаться в 2,2,4-триметил-6(2H)-хинолинон – метаболит этоксихина, проявляющий прооксидантные, мутагенные и канцерогенные свойства. Таким образом, для ДГХ2 была снижена вероятность проявления токсических эффектов. Анализ токсичности *in silico* с помощью сервиса ProTox-II показал, что ДГХ1 и ДГХ2 относятся к 4 классу токсичности с предсказанной ЛД50 1450 мг/кг и ЛД50 800 мг/кг соответственно. Исходя из этого, применяемые дозировки производных дигидрохинолина – 25 и 50 мг/кг – были существенно ниже, чем ЛД50 данных соединений.

2. Воздействие дигидрохинолиновых производных на маркерные показатели развития токсического поражения печени у крыс

Результаты проведенных биохимических тестов показали, что активность маркерных ферментов, в частности, АлАТ, АсАТ и гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) резко возрастала при развитии ТПП (рис. 1). У крыс, получавших при ТПП препарат сравнения – карсил, активность маркерных ферментов уменьшалась в 2,5, 2,1 и 1,4 раза соответственно, по сравнению с группой животных с патологией. При введении ДГХ1 в дозе 25 мг/кг веса, активность данных ферментов в сыворотке крови снижалась в 1,9, 1,7 и 2,2 раза относительно значений при ТПП. Введение ДГХ1 в более высокой дозировке, 50 мг/кг веса, приводило к достоверно более выраженным изменениям активности ферментов, в том числе по сравнению с показателями крыс, получавших на фоне патологии карсил. Так, активность АлАТ и АсАТ снижалась в 2,9 и 2,5 раз по сравнению с животными с патологией, а значения ГГТП приближались к контрольным показателям.

ДГХ2, используемый в дозе 50 мг/кг, по эффективности воздействия на маркерные ферменты поражения печени достоверно не отличался от карсила. В то же время, применение данного соединения в дозе 25 мг/кг на фоне ТПП приводило к снижению активности АЛАТ, АсАТ и ГГТП в 6,0, 3,7 и 4,1 раза соответственно, что было более существенно, чем при введении на фоне патологии карсила. Таким образом, оба исследуемых производных дигирохинолина оказывали более выраженное воздействие на маркерные показатели цитолиза гепатоцитов, чем препарат сравнения. При этом, ДГХ2 проявлял наибольший эффект в меньшей дозировке – 25 мг/кг.

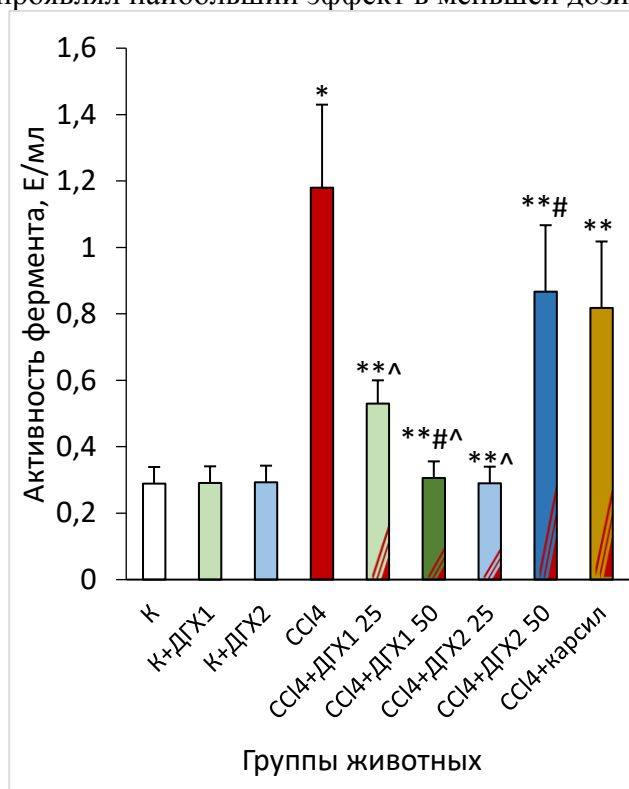


Рисунок 1. Активность гамма-глутамилтранспептидазы в сыворотке крови крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (СС14), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СС14+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (К+ДГХ2).

Здесь и далее: * - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

3. Анализ морфологических изменений в печени крыс при развитии токсического поражения печени и воздействии дигидрохинолиновых производных

В ходе проведённых нами исследований срезов печени, окрашенных гематоксилином и эозином, было показано отсутствие каких-либо признаков повреждения у животных контрольной группы (рис. 2А). У группы животных с ТПП наблюдалось тяжёлое гепатоцеллюлярное повреждение, характеризующееся обширными участками некроза и значительной потерей архитектуры ткани (рис. 2Б). У крыс с ТПП, получавших ДГХ1 в дозе 50 мг/кг крысам, наблюдалось снижение выраженности некроза ткани печени и нарушения её архитектуры (рис. 2В). Ткань печени контрольных животных, получавших ДГХ1, соответствовала гистологической картине крыс первой группы, где большинство гепатоцитов были нормальными с ацидофильной цитоплазмой и везикулярными ядрами (рис. 2Г). На фоне введения ДГХ2 также визуализировалось менее тяжёлое повреждение печени с менее существенной, очаговой гепатоцеллюлярной дегенерацией (рис. 3В), по сравнению с гистопатологическими изменениями у животных с ТПП (рис. 3Б). Введение карсила животным с поражением печени также оказывало протекторный эффект на

морфологию ткани печени (рис. 3Г), который был несколько менее выражен по сравнению с действием тестируемых хинолиновых производных.

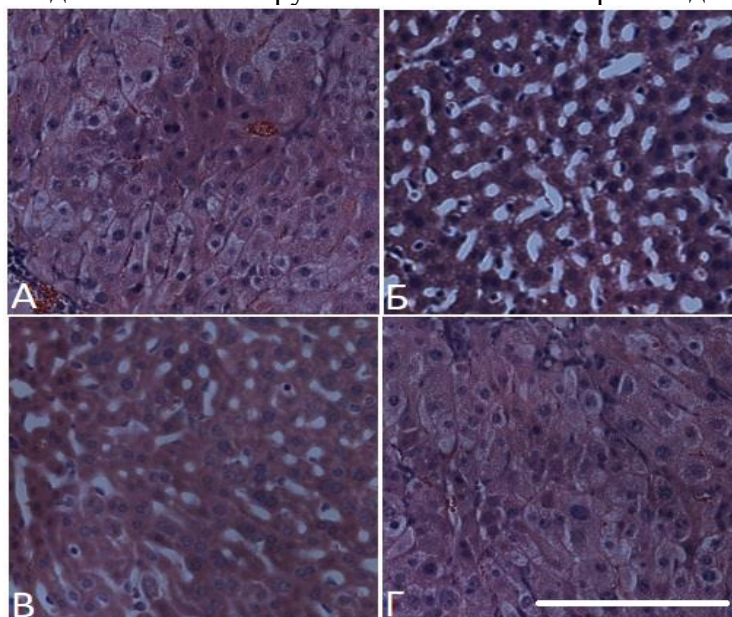


Рисунок 2. Срезы тканей печени, окрашенные гематоксилином и эозином, крыс контрольной группы (А), животных с тетрахлолметановым поражением печени (Б), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 50 мг/кг (В), а также контрольных животных, подверженных введению 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина в дозе 50 мг/кг (Г). Шкала на рисунке соответствует 100 мкм.

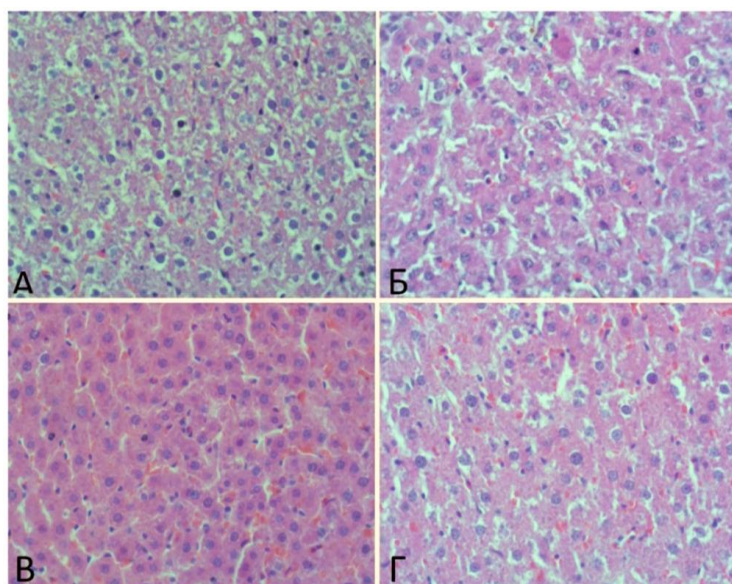


Рисунок 3. Срезы тканей печени, окрашенные гематоксилином и эозином, крыс контрольной группы (А), животных с тетрахлолметановым поражением печени (Б), крыс с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 50 мг/кг (В), и крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (Г). Шкала на рисунке соответствует 200 мкм.

ВЛИЯНИЕ ДИГИДРОХИНОЛИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ

В ходе исследования было установлено, что введение обоих тестируемых соединений в дозах 25 и 50 мг/кг приводило к значимому снижению показателей БХЛ у крыс с ТПП. При этом, ДГХ1 был более эффективен в дозе 50 мг/кг. Так, у животных, получавших данное соединение в большей дозировке на фоне ТПП, показатели I_{max} , S и $tga2$ снижались соответственно в 1,6, 2,3 и 1,3 раза в печени, и в 2,0, 2,4 и 1,9 раза в сыворотке крови. В то же время, для ДГХ2 не было показано дозозависимого воздействия на показатели БХЛ, за исключением I_{max} в сыворотке крови. Введение данного соединения в дозе 50 мг/кг способствовало снижению I_{max} , S и $tga2$ в сыворотке крови в 2,4, 2,3 и 2,2 раза, а в печени животных – в 2,2, 2,4 и 1,9 раза, относительно показателей при ТПП. Использование в качестве гепатопротектора карсила при поражении печени также приводило к уменьшению показателей БХЛ. Однако, ДГХ2 по сравнению с карсилом более эффективно уменьшал показатели I_{max} и $tga2$ в печени, а при использовании в дозе 50 мг/кг – ещё и I_{max} и $tga2$ в сыворотке крови животных. В свою очередь, ДГХ1 при использовании

в дозе 50 мг/кг оказался эффективнее карсила только по отношению к I_{тах} в печени лабораторных животных.

Введение ДГХ1 животным с ТПП сопровождалось уменьшением уровня ОМБ в печени, тогда как использование в качестве протектора ДГХ2 способствовало снижению данного показателя и в печени, и в сыворотке крови. Так, администрация крыс с патологией ДГХ2 в дозе 25 мг/кг приводила к снижению содержания карбонильных остатков аминокислот в белках в сыворотке крови и печени в 1,4 и 1,5 раза, а применение вещества в дозе 50 мг/кг – в 1,2 и 1,4 раза соответственно. Кроме этого, использование ДГХ2 в обеих дозах, и ДГХ1 в дозе 50 мг/кг вызывало более существенное снижение уровня ОМБ в печени по сравнению с карсилом.

Введение животным с ТПП тестируемых дигидрохинолиновых производных и карсила приводило к достоверному снижению концентрации ДК. При этом, ДГХ1 в дозе 50 мг/кг оказывал более сильный эффект на данный показатель по сравнению с карсилом. Так, на фоне введения тестируемого хинолинового производного уровень ДК снижался в сыворотке крови и печени крыс в 1,9 и 1,6 раза соответственно, относительно значений при ТПП. ДГХ2 вызывал более выраженное по сравнению с карсилом понижение концентрации ДК в сыворотке крови при использовании в дозе 25 мг/кг: содержание первичных продуктов ПОЛ изменялось в 1,8 раза относительно значений при ТПП. В печени животных наблюдалось более существенное снижение уровня ДК в случае применения ДГХ2 в обеих дозах: изменения относительно значений при патологии происходили в 1,8 и 1,5 раза при использовании доз 25 и 50 мг/кг соответственно.

Как известно, при окислительном стрессе происходит разрушение железо-серных кластеров АГ, приводящее к снижению активности фермента [15]. В то же время, при ингибировании АГ накапливается цитрат, который препятствует дальнейшему образованию гидроксильного радикала. В результате проведенных нами исследований было установлено, что у животных с ТПП происходило падение активности АГ в сыворотке в 1,7 раза, в печени в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой. В печени животных, получавших ДГХ2 в дозе 25 мг/кг на фоне ТПП, активность АГ возрастала в 1,8 раза – значительнее, чем под действием карсила. Введение ДГХ2 в дозе 50 мг/кг на фоне ТПП обеспечивало достоверное увеличение активности АГ и в печени, и в сыворотке крови в 1,7 раза. ДГХ1 в обеих исследуемых дозах способствовал повышению активности АГ в сыворотке крови и печени животных с ТПП. Так, введение ДГХ1 крысам с патологией в дозе 25 и 50 мг/кг приводило к увеличению активности АГ в сыворотке в 1,5 и 1,6 раза, что превосходило по эффективности изменения, вызванные карсилом. Схожая тенденция наблюдалась и в отношении удельной активности фермента.

Использование в качестве протекторного средства ДГХ1 достоверно уменьшало концентрацию цитрата у животных с ТПП, однако значимых отличий от результатов, полученных при использовании карсила, выявлено не было. Введение ДГХ2 в дозе 50 мг/кг оказало более выраженное действие по сравнению с карсилом, способствуя снижению данного показателя в 2,0 раза в сыворотке крови, и в 2,1 раза в печени.

Вероятно, обнаруженные изменения показателей БХЛ, содержания ДК и карбонильных остатков аминокислот в белках, а также активности АГ и концентрации цитрата обусловлены проявлением тестируемыми дигидрохинолиновыми производными антиокислительных свойств в условиях ТПП.

ИНТЕНСИВНОСТЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ У КРЫС ПРИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ И ВВЕДЕНИИ 6-ГИДРОКСИ-2,2,4-ТРИМЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИНА И 1-БЕНЗОИЛ-6-ГИДРОКСИ-2,2,4-ТРИМЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИНА

Представленные в литературе данные свидетельствуют, что интенсификация процессов свободнорадикального окисления, вызванная токсическим воздействием ССl₄, сопровождается изменением экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов, таких как

IL-1 β , IL-6 и TNF- α , циклооксигеназы-2 (COX2) – фермента, который метаболизирует арахидоновую кислоту до простагландинов, а также активацией миелопероксидазы (МПО), отражающей степень нейтрофильной инфильтрации печени [16]. Поскольку центральную роль в воспалительном ответе и активации экспрессии важнейших воспалительных генов играет транскрипционный фактор NF- κ B [17], подавление его сигнального пути является одной из основных мишеней для ослабления воспаления и связанных с ним заболеваний.

Полученные нами данные об индукции генов цитокинов при ТПП согласуются с имеющимися в литературе данными [18]. В частности, индукция ТПП у крыс сопровождалась возрастанием активности МПО в печени в 6,0 раза (рис. 4А), а также увеличением уровня транскриптов генов *Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Ptgs2* и *Nfkb2* (кодирующих, соответственно, IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX2 и предшественник p100 фактора NF- κ B) в 1,8, 1,9, 1,5, 2,4 и 1,3 раза, относительно показателей контроля (рис. 4Б).

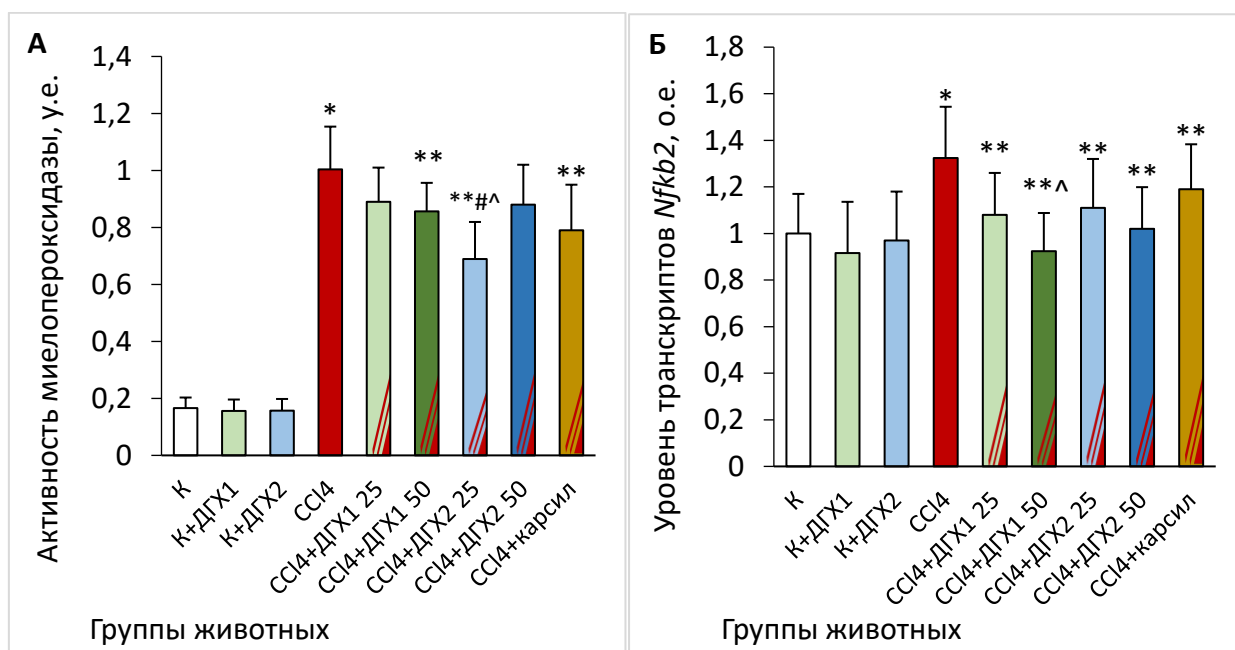


Рисунок 4. Активность миелопероксидазы (А) и уровень мРНК генов *Nfkb2* (Б) в печени в печени крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (СС14), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СС14+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (К+ДГХ2).

Введение дигидрохинолиновых производных приводило к снижению показателей, отражающих интенсивность воспалительных процессов. Так, при применении ДГХ1 в дозе 50 мг/кг и ДГХ2 в дозе 25 мг/кг наблюдалось снижение активности МПО у крыс с ТПП в 1,2 и 1,5 раза. При этом, использование в качестве протектора ДГХ2 обеспечивало более существенное снижение активности МПО по сравнению с карсилом. Уровень транскриптов *Il1b* и *Il6*, *Tnf* снижался сильнее у всех групп животных, получавших на фоне ТПП дигидрохинолиновые производные, по сравнению с крысами, получавшими карсил. Так, содержание мРНК *Il1b* и *Il6* падало при применении ДГХ1 в дозе 25 мг/кг в 1,5 и 2,0 раза, в случае применения дозы 50 мг/кг – в 1,8 и 2,1 раза, относительно данных при патологии. Концентрация мРНК *Il1b* и *Il6* при введении на фоне ТПП ДГХ2 в дозе 25 мг/кг снижалась в 2,0 раза, а при введении ДГХ2 в дозировке 50 мг/кг – в 2,0 и 2,1 раза. В отношении транскриптов *Tnf* эффективнее карсила выступал только ДГХ2, при использовании

которого в дозах 25 и 50 мг/кг данный показатель снижался в 1,6 и 1,7 раза относительно значений при патологии. Та же тенденция наблюдалась и по отношению к содержанию мРНК *Ptgs2*: данный показатель снижался при использовании ДГХ2 в дозах 25 и 50 мг/кг в 2,2 и 2,4 раза. Содержание транскриптов *Nfkb2* достоверно снижалось под действием всех протекторов относительно значений при ТПП (рис. 4 Б). Эффективнее же карсила по отношению к данному показателю проявил себя ДГХ1 в дозе 50 мг/кг, обеспечивающий его снижение в 1,4 раза относительно значений при патологии.

Воспалительный ответ, развивающийся при остром повреждении печени, опосредован активацией NLRP3 инфламмосомы [19; 20]. NLRP3 инфламмосома представляет собой мультибелковый внутриклеточный комплекс, активирующийся при инфекции или стрессе и обеспечивающий созревание провоспалительных цитокинов с последующей активацией иммунной защиты. Так, NLRP3-инфламмосома способна индуцировать сериновую протеазу, активирующую каспазу-1, которая, в свою очередь, расщепляет про-IL-1 β и про-IL-18 до их зрелых секретлируемых форм IL-1 β и IL-18. IL-1 β функционирует как регуляторный медиатор провоспалительных цитокинов, который играет центральную роль в реализации врожденных и адаптивных иммунных реакций [21]. Проведенные нами исследования показали, что экспрессия продуктов NLRP3 инфламмосомы – активированной каспазы-1 и расщепленного IL-1 β – была значительно повышена у животных с ТПП по сравнению с контролем. В свою очередь, введение ДГХ1 тормозило активацию NLRP3, а также приводило к снижению уровня активированной каспазы-1 и зрелой формы IL-1 β . Вероятно, в качестве важного механизма реализации гепатопротекторного и противовоспалительного эффекта дигирохинолиновых производных могла выступать их способность ингибировать активацию NLRP3-инфламмосомы. По-видимому, данный эффект, наряду с возможностью прямого обезвреживания реактивных молекул, составлял главную причину позитивного воздействия тестируемых соединений на выраженность окислительного стресса – центрального патогенетического фактора ТПП.

ВОЗДЕЙСТВИЕ 6-ГИДРОКСИ-2,2,4-ТРИМЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИНА И 1-БЕНЗОИЛ-6-ГИДРОКСИ-2,2,4-ТРИМЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ У КРЫС

С целью оценки интенсивности апоптотических процессов нами были проанализированы уровни активности индукторной каспазы-8, участвующей в передаче апоптотического сигнала от рецепторов лигандов смерти, и эффекторной каспазы-3, осуществляющей протеолиз белков-мишеней и вызывающей морфологические изменения в клетках, характерные для апоптоза. Так, у животных с патологией активность каспазы-3 и каспазы-8 увеличивалась в 2,4 и 2,3 раза, по сравнению с контролем (рис. 5). Также нами было показано, что моделирование ТПП сопровождалось возрастанием в 3,3 раза уровня транскриптов фактора AIF – белка митохондриального межмембранного пространства, который при повышении проницаемости наружной митохондриальной мембраны высвобождается и транслоцируется в ядро, вызывая двухцепочечные разрывы и конденсацию ДНК. По-видимому, проявляя противовоспалительные и антиокислительные свойства, ДГХ1 способствовал уменьшению уровня сигналов, опосредующих активацию как митохондриального, так и лиганд-опосредованного путей апоптоза. В то же время, в ходе проводимых нами исследований было показано, что ДГХ2 не оказывал эффекта на активность каспазы-3, каспазы-8 и уровень мРНК AIF. Возможно, лимитирующим фактором при применении ДГХ2 могла быть длительность проведения эксперимента, составлявшая 4 дня от момента введения CCl₄, что было недостаточно для отслеживания значимого эффекта соединения на активность каспаз.

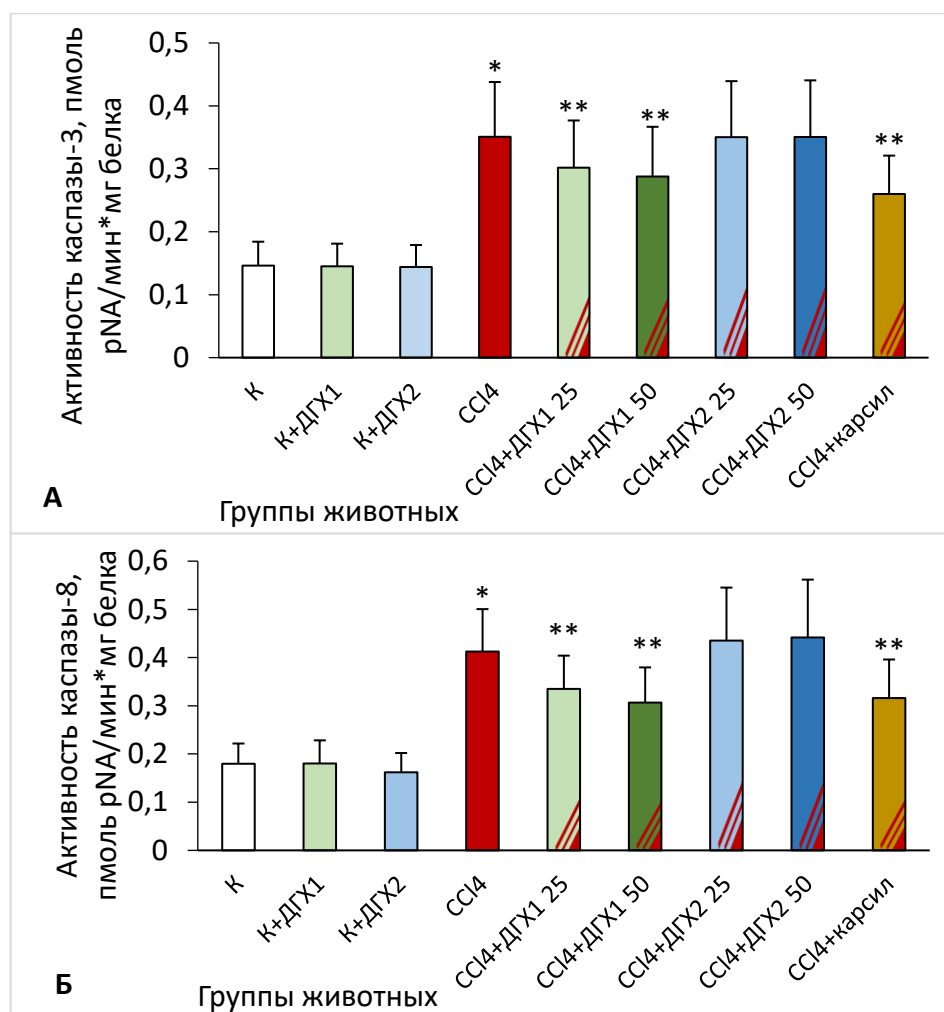


Рисунок 5. Активность каспазы-3 (А), каспазы-8 (Б) в печени крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (СС14), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СС14+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

ВОЗДЕЙСТВИЕ ДИГИДРОХИОЛИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС С ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ

Как показали наши исследования, развитие ТПП у крыс приводило к возрастанию активности СОД и каталазы, что, по-видимому, являлось результатом адаптивной реакции на введение ксенобиотика и развитие окислительного стресса. Так, известно, что результатом стрессорного воздействия на клетку является индукция стрессового ответа, для которого может быть характерна как активация, так и торможение определенных метаболических процессов, в зависимости от длительности и силы раздражающего воздействия. Так, было показано, что развитие ТПП у крыс приводило к возрастанию активности СОД и каталазы (рис. 6), что, по-видимому, являлось результатом адаптивной реакции на введение ксенобиотика и развитие окислительного стресса.

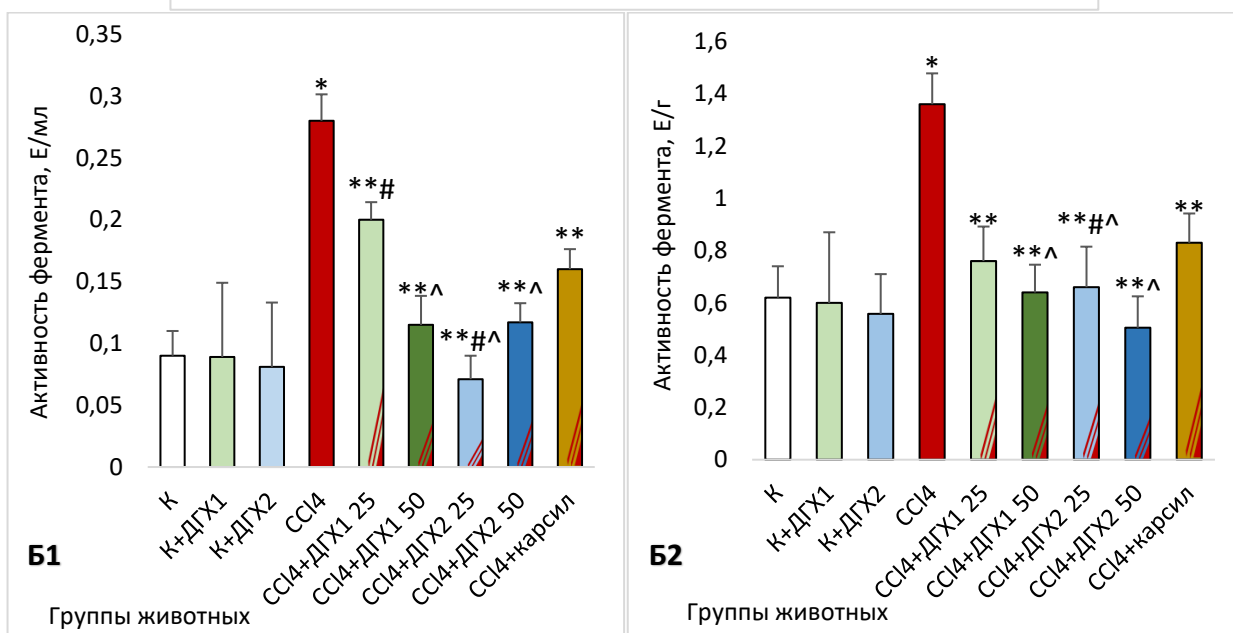
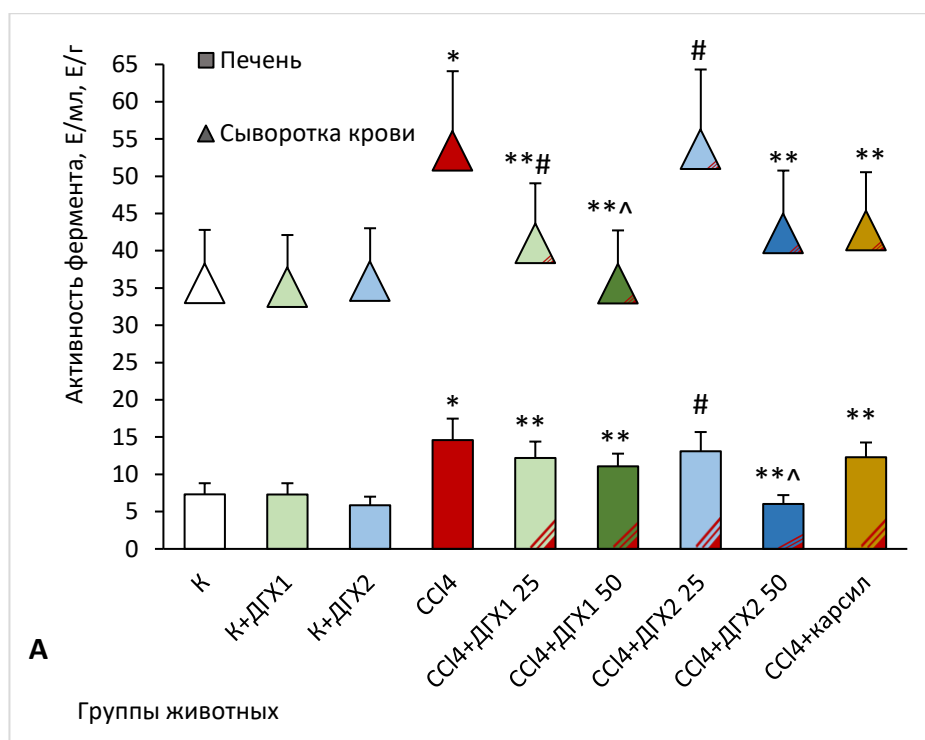


Рисунок 6. Активность супероксиддисмутазы (А), представленная в Е/мл сыворотки и Е/г сырой массы печени, и активность каталазы (Б1) в сыворотке крови и печени (Б2) крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (СС14), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СС14+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

Введение дигидрохиолиновых производных крысам на фоне развития патологии способствовало изменению активности СОД и каталазы в направлении контрольных значений. Наибольшие сдвиги активности СОД наблюдались при введении ДГХ1 и ДГХ2

в дозе 50 мг/кг. Так, активность фермента в сыворотке крови животных уменьшалась в этих условиях в 1,5 и 1,3 раза относительно данных при патологии, причём ДГХ1 приводил к достоверно более существенным изменениям по сравнению с карсилем (рис. 6 А). В печени животных с ТПП, подверженных введению ДГХ1 и ДГХ2 в дозе 50 мг/кг, активность СОД снижалась в 1,3 и 1,4 раза, при этом более выраженное действие в сравнении с карсилем оказывал ДГХ2. По отношению к активности каталазы в сыворотке крови экспериментальных животных также был продемонстрирован дозозависимый эффект дигидрохинолиновых производных. ДГХ1 оказывал более существенное воздействие на данный показатель в дозировке 50 мг/кг: активность фермента при этом снижалась в 2,4 раза относительно значений при ТПП, причём изменения были более существенны, чем при введении карсила. ДГХ2 оказывал более сильное действие в обеих дозах относительно препарата сравнения. При этом, использование вещества в дозировке 25 мг/кг существенно изменяло активность каталазы по направлению к контрольным значениям, чем в дозе 50 мг/кг. Так, введение крысам с ТПП ДГХ2 в дозах 25 и 50 мг/кг приводило к снижению активности фермента в 3,9 и 2,4 раза.

Схожая тенденция наблюдалась для активности каталазы в печени экспериментальных животных: больший эффект по сравнению с карсилем оказало введение ДГХ1 в дозе 50 мг/кг и ДГХ2 в обеих дозах (рис 6 Б). При использовании в качестве протектора ДГХ1 в дозе 50 мг/кг активность фермента снижалась в 2,1 раза относительно данных при ТПП. Наблюдаемые изменения, очевидно, были связаны со снижением уровня окислительного стресса под действием дигидрохинолиновых производных и последующим уменьшением окислительной нагрузки на АОС.

В ходе изучения уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов было показано, что индукция ТПП сопровождалась значительным возрастанием уровня мРНК генов *Sod1* и *Cat*. Кроме того, происходило накопление транскриптов генов факторов, играющих центральную роль в реализации клеточной защиты от действия свободных радикалов – Nrf2 и FOXO1 (рис. 7).

Как показали результаты нашей работы, уровень мРНК гена *Cat* у животных с ТПП при введении ДГХ1 в дозе 25 и 50 мг/кг снижался в 1,4 и 1,5 раза, а применение ДГХ2 на фоне патологии способствовало понижению уровня мРНК в 1,3 и 1,5 раза (см. рис. 7). Содержание мРНК *Sod1* также снижалось под действием ДГХ1 в обеих дозах в 1,2 раза относительно значений при патологии. В то же время, ДГХ2 в дозировке 50 мг/кг оказывал стимулирующее действие на транскрипцию *Sod1*: данный показатель возрастал в 1,9 раза по сравнению со значениями при ТПП. Уровень мРНК гена *Nfe2l2* (фактора Nrf2) достоверно снижался только под действием ДГХ1 в дозировках 25 и 50 мг/кг, причём изменения были существеннее, чем таковые при введении карсила. Так, уровень транскриптов анализируемого гена падал в 1,6 и 1,8 раза, относительно данных при ТПП. В свою очередь, ДГХ2 в дозах 25 и 50 мг/кг способствовал возрастанию содержания мРНК *Foxo1* в 1,3 и 1,5 раза, относительно значений при ТПП.

Проведенные исследования продемонстрировали, что дигидрохинолиновые производные оказывали более существенное по сравнению с карсилем воздействие на функционирование СОД и каталазы у крыс с ТПП. Следует также отметить наличие дополнительного стимулирующего эффекта ДГХ2 на транскрипцию *Sod1* и редокс-чувствительных факторов Nrf2 и FOXO1, что, помимо прямого антиоксидантного действия вещества, также может лежать в основе снижения интенсивности свободнорадикального окисления при ТПП. В литературе имеются сведения о стимулирующем действии дигидрохинолиновых производных на редокс-чувствительные транскрипционные факторы [22]. По-видимому, с подобным активирующим воздействием ДГХ2 на FOXO1 связан тот факт, что при снижении интенсивности окислительного стресса и нормализации

активности ферментов АОС под действием тестируемого вещества содержание мРНК *Sod1* находилось все ещё на повышенном уровне.

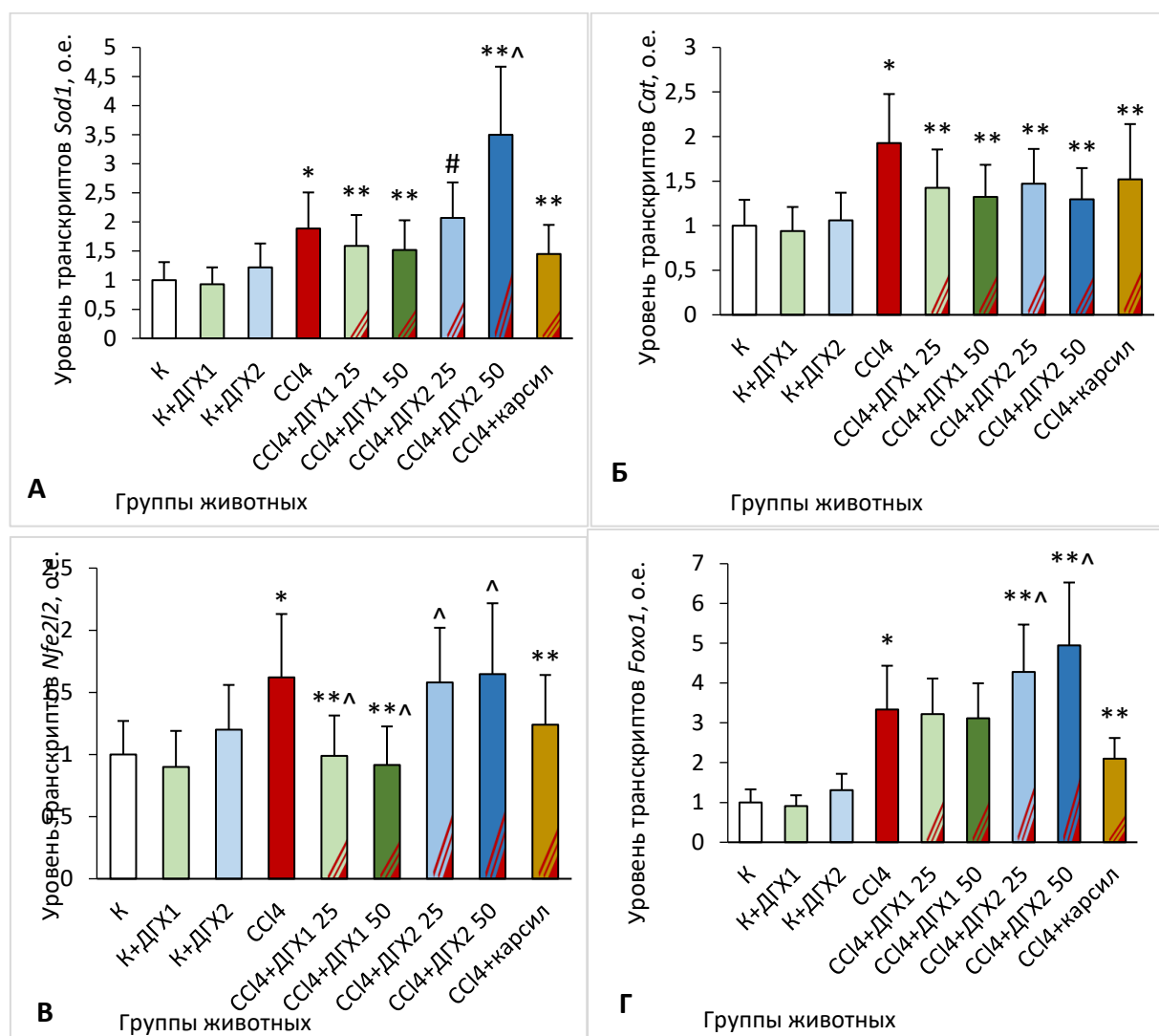


Рисунок 7. Уровень мРНК генов *Sod1* (А), *Cat* (Б), *Nfe2l2* (В) и *Foxo1* (Г) в печени крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлометановым поражением печени (СС14), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СС14+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

Результаты проведенной нами работы показали, что у крыс с ТПП наблюдалось разнонаправленное изменение показателей, отражающих функционирование глутатионовой АОС (рис. 8). Было показано, что в печени лабораторных животных, получавших ДГХ1 и ДГХ2, показатель активности ГП изменялся более существенно, чем у крыс, которым на фоне патологии вводили карсил. Так, активность ГП, представленная в Е/г сырой массы ткани, понижалась под действием ДГХ1 в дозе 25 и 50 мг/кг в 1,5 и 1,6 раза, а при введении ДГХ2 – в 3,9 и 4,2 раза, относительно значений при ТПП. Развитие патологии сопровождалось снижением активности ГТ в печени экспериментальных животных. ДГХ2 при введении крысам с ТПП в дозах 25 и 50 мг/кг способствовал повышению активности данного фермента в 1,5 и 2,4 раза, причём применение большей дозировки оказывало более выраженный эффект, чем использование карсила.

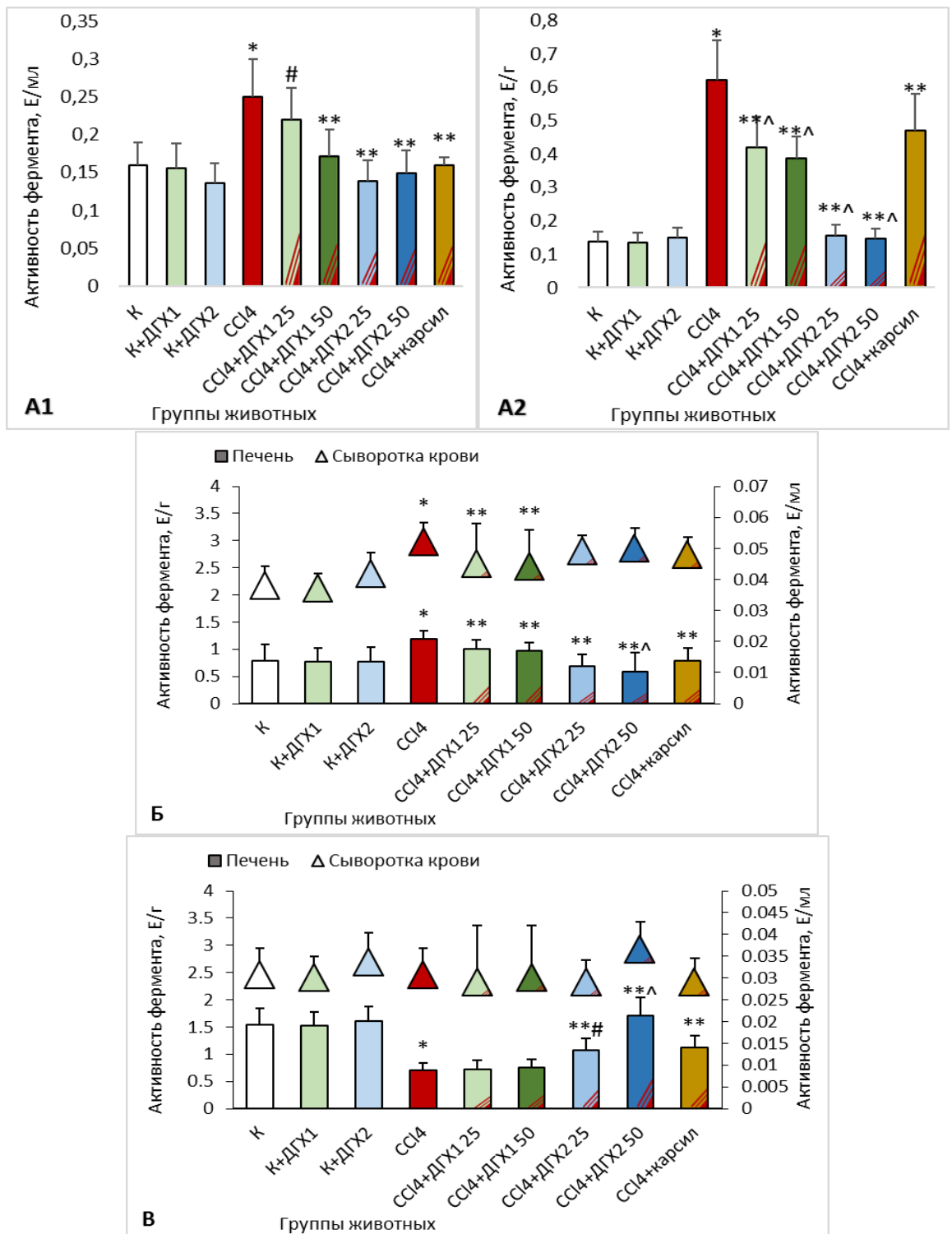


Рис. 8. Активность глутатионпероксидазы, представленная в Е/мл сыворотки крови (А1) и Е/г сырой массы ткани печени (А2), активность глутатионредуктазы (Б) и глутатионтрансферазы (В) в сыворотке крови и печени крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (ССl4), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl4+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (ССl4+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl4+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (ССl4+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (ССl4+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

Концентрация GSH, понижавшаяся в сыворотке животных с ТПП, увеличивалась под действием ДГХ2 в дозе 50 мг/кг в 1,3 раза. В печени животных с патологией уровень данного тиола был выше контрольных значений, а введение дигидрохинолиновых производных способствовало его уменьшению. Помимо этого, оба тестируемых протектора эффективнее карсила восстанавливали уровень α -токоферола в сыворотке крови животных с патологией.

Изменение активности ферментов глутатионовой АОС у крыс с ТПП сопровождалось соответствующими сдвигами в содержании мРНК генов данных ферментов. Так, для крыс с патологией было характерно возрастание уровня транскриптов генов *Gpx1* и *Gsr*, а также снижение мРНК гена *Gsta2* (рис. 9). Введение ДГХ1 на фоне ТПП не оказывало значимого воздействия на уровень мРНК *Gpx1*, а введение ДГХ2 в дозах 25 и 50 мг/кг способствовало дополнительному возрастанию данного показателя относительно значений при патологии в 1,8 и 1,9 раза. Стимулирующее воздействие ДГХ2 на уровень транскриптов *Gpx1* могло быть опосредовано транскрипционной регуляцией FOXO1, экспрессия генов которого также увеличивалась при введении данного соединения (см. рис. 7). При этом, по-видимому, вовлечения в трансляцию значительной части мРНК *Gpx1* не происходило, поскольку под действием ДГХ2 существенно снижалась интенсивность свободнорадикального окисления у крыс с патологией и, как следствие, уменьшалась выраженность компенсаторного ответа АОС. Для мРНК гена *Gsta2* в печени крыс, получавших на фоне ТПП тестируемые соединения, было зарегистрировано возрастание концентрации, выраженное более сильно, чем таковое на фоне применения карсила. Так, администрация животных с патологией ДГХ1 в дозах 25 и 50 мг/кг приводила к увеличению мРНК *Gsta2* в 3,1 и 3,4 раза, а ДГХ2 – в 4,9 и 7,7 раза. При этом, ДГХ2 в большей дозировке обуславливал накопление мРНК *Gsta2*, превышающее контрольные показатели. Отсутствие выраженного стимулирующего действия ДГХ1 и ДГХ2 на *Gsr* может быть обусловлено достаточной концентрацией GSH, достигающейся в условиях введения протекторов. Известно, что Nrf2 в ответ на повышение концентрации GSSG способен регулировать экспрессию *Gsr* дифференцированно от генов ГП. Анализ промотора *Gsr in silico* выявил три потенциальных ARE участка, с которыми связывается Nrf2. В то же время показано, что два из трёх участков ARE в промоторе гена функциональны в различной степени, и Nrf2 посредством них регулирует индуцибельную экспрессию *Gsr* в ответ на изменение редокс-статуса, но не регулирует базальную экспрессию гена [23].

В результате проведённых исследований было выяснено, что дигидрохинолиновые производные оказывали более существенный эффект на функционирование АОС у крыс с ТПП по сравнению с карсилом. При этом, для ДГХ2 было характерно наличие стимулирующего эффекта на транскрипцию ряда антиоксидантных генов у животных с патологией.

Полученные результаты показали, что моделирование ТПП у крыс сопровождалось возрастанием активности НАДФ-ИДГ, представленной в виде Е/мл сыворотки крови и Е/г сырой массы ткани печени в 1,5 и 1,6 раза, а активность Г6ФДГ увеличивалась в 2,0 и 1,8 раза. Полученные данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями о роли НАДФН-генерирующих ферментов в защите тканей печени от окислительного стресса [24].

В ходе нашей работы было выяснено, что введение дигидрохинолиновых производных на фоне ТПП способствовало нормализации активности НАДФ-ИДГ и Г6ФДГ. По отношению к активности Г6ФДГ в сыворотке крови эффективнее карсила оказался ДГХ1 при использовании в дозе 50 мг/кг, а также ДГХ2 при введении в дозе 25 мг/кг. Так, администрация крыс с ТПП тестируемыми веществами в указанных дозах приводила к снижению данного показателя в 1,8 и 2,5 раза. В печени крыс воздействие ДГХ1 в дозах 25 и 50 мг/кг способствовало уменьшению активности Г6ФДГ в 1,3 и 1,4 раза, а ДГХ2 в дозе 50 мг/кг – в 3,1 раза, относительно значений при ТПП.

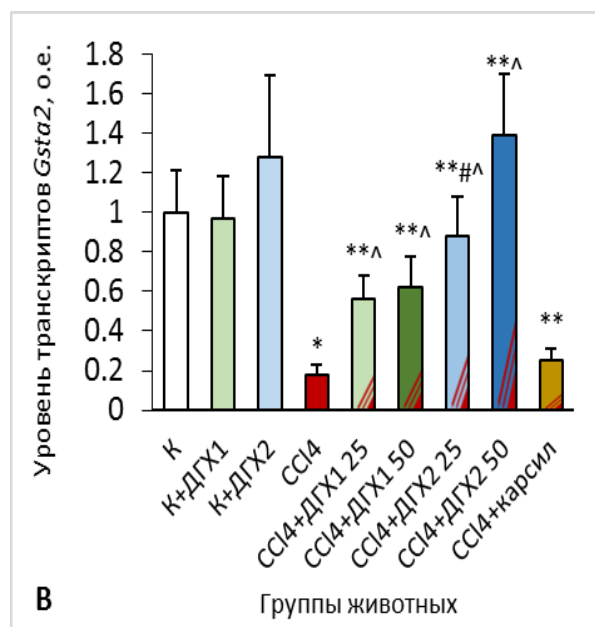
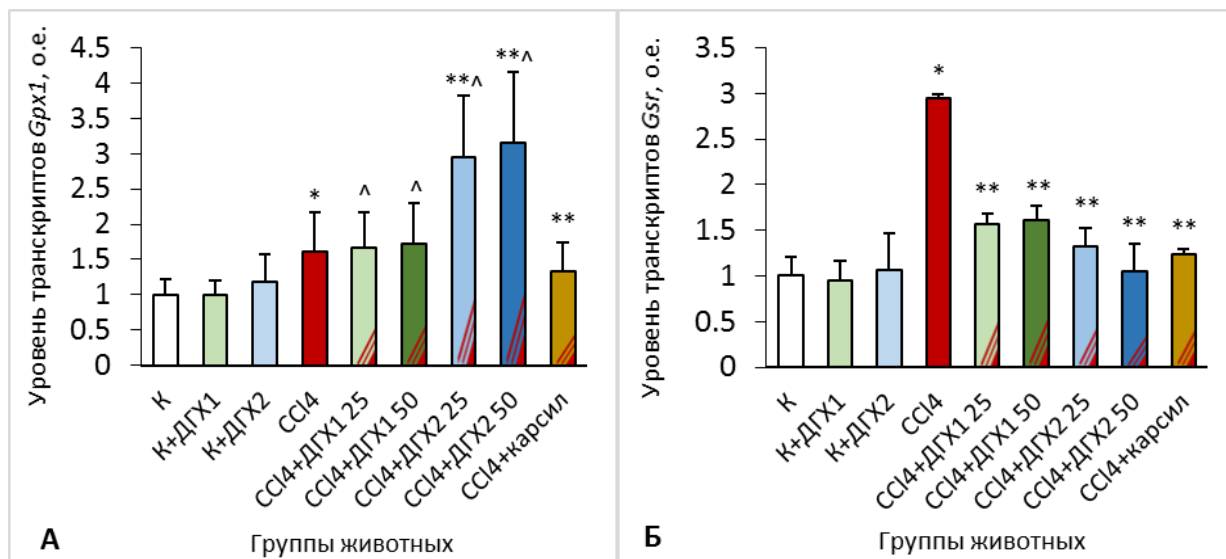


Рисунок. 9. Содержание мРНК генов *Gpx1* (А), *Gsr* (Б) и *Gsta2* (В) в печени крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (СС14), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СС14+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

Очистка и исследование некоторых каталитических свойств глутатионпероксидазы из печени крыс с тетрахлорметановым поражением печени, получавших дигидрохиолиновое производное

Как показали результаты нашей работы, в печени крыс с ТПП наиболее выраженное воздействие по сравнению с карсилом дигидрохиолиновые производные оказывали на активность ГП. Для исследования некоторых каталитических и регуляторных свойств ГП использовали очищенный препарат фермента.

В ходе работы было выяснено, что введение крысам с ТПП ДГХ1 в дозе 50 мг/кг приводило к изменению в направлении контрольных значений Км по отношению к GSH и оптимума рН у ГП, для которой при патологии было характерно повышение сродства к данному субстрату и сдвиг оптимума рН в кислую сторону. В ходе оценки регуляторного воздействия на активность ГП изоцитрата (ИЦ) и глюкозо-6-фосфата (Г6Ф) – субстратов ключевых ферментов-поставщиков НАДФН для глутатионовой АОС, было продемонстрировано, что при введении крысам с ТПП ДГХ1 зависимость активности ГП от концентрации данных метаболитов имела динамику, близкую к таковой у животных

контрольной группы. Результаты исследования также показали, что у крыс с ТПП, которым вводили дигидрохинолиновое производное, в отличие от животных из группы с патологией, не наблюдалось ингибирование фермента при концентрациях Fe^{2+} в реакционной среде свыше 0,2 мМ. Полученные данные свидетельствуют, что тестируемое соединение, наряду с изменением уровня свободнорадикального окисления и транскрипции генов антиоксидантных белков, оказывает регуляторное действие на АОС через модуляцию свойств молекул ферментов данной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Острое повреждение печени, индуцированное CCl_4 , обусловлено развитием окислительного стресса, на фоне которого может происходить активизация воспалительного ответа и различных путей гибели клеток, включая апоптоз. В связи с этим интерес с точки зрения поиска новых гепатопротекторных средств представляют дигидрохинолиновые производные, для которых характерно наличие существенного антиокислительного потенциала. В ходе нашей работы с помощью программы прогноза биологической активности PASS было отобрано два соединения из данного класса – ДГХ1 и ДГХ2.

В ходе работы было продемонстрировано, что введение ДГХ1 и ДГХ2 крысам с ТПП приводило к снижению уровня маркерных ферментов цитолиза гепатоцитов и выраженности гистопатологических изменений в печени. На основании полученных результатов были предложены механизмы гепатопротекторного действия тестируемых дигидрохинолиновых производных, которые заключались в торможении интенсивности процессов свободнорадикального окисления, снижении уровня воспалительного ответа и его NLRP3-опосредованной регуляции, уменьшении выраженности процессов апоптоза, а также модулирующем воздействии на функционирование АОС и уровень транскриптов генов антиоксидантов. Основные патогенетические механизмы развития ТПП и мишени воздействия ДГХ отражены на схеме, представленной на рисунке 10.

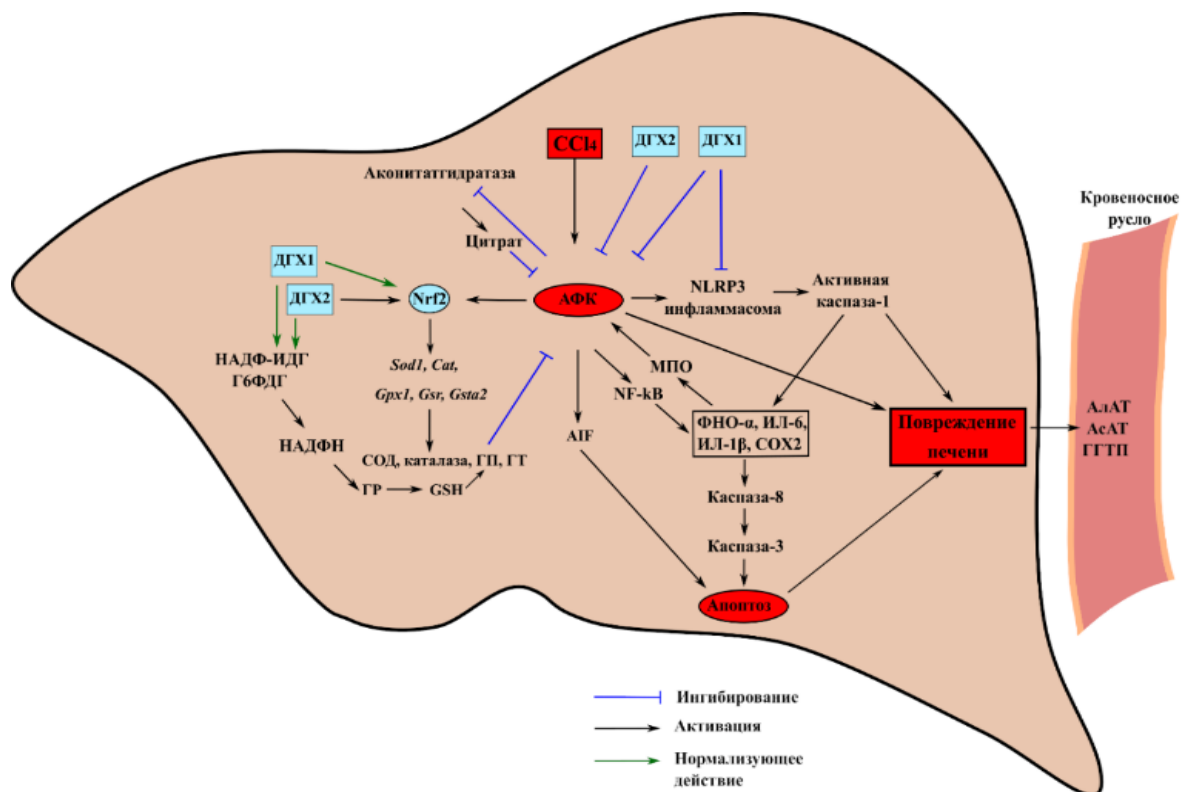


Рисунок 10. Гипотетическая схема воздействия дигидрохинолиновых производных на основные патогенетические механизмы развития токсического поражения печени и регуляцию функционирования антиоксидантной системы.

ВЫВОДЫ

1. Отобранные на основе компьютерного прогнозирования биологической активности соединения – ДГХ1 и его структурный аналог ДГХ2 – оказывали значительно более выраженное гепатопротекторное действие при тетрахлорметановом поражении печени у крыс по сравнению с карсиллом, что выражалась в более существенном снижении активности маркерных ферментов цитолиза гепатоцитов и степени гистопатологических изменений в ткани печени.

2. ДГХ1 и ДГХ2 проявляли антиоксидантное действие при токсическом поражении печени, о чём свидетельствовало уменьшение параметров биохемилюминесценции, содержания первичных продуктов пероксидного окисления липидов и уровня карбонильных остатков аминокислот в белках, а также восстановление активности аконитатгидратазы.

3. Тестируемые дигидрохинолиновые производные тормозили развитие воспалительного ответа в условиях токсического поражения печени у крыс посредством уменьшения уровня транскриптов гена фактора NF-κB и экспрессии NLRP3-инфламмосомы, что сопровождалось снижением содержания мРНК провоспалительных цитокинов и активности миелопероксидазы.

4. ДГХ1 снижал активность каспаз и содержание мРНК апоптоз-индуцибельного фактора AIF у животных с патологией, что говорит о наличии у тестируемого соединения способности регулировать интенсивность апоптоза.

5. Введение дигидрохинолиновых производных крысам с ТПП способствовало нормализации активности ферментов антиоксидантной защиты и концентрации неферментативных антиоксидантов. Наблюдалось изменение активности НАДФН-генерирующих ферментов в направлении контроля под действием ДГХ1 и ДГХ2, что могло вносить существенный вклад в снижение выраженности дисбаланса в функционировании глутатионовой АОС.

6. Применение ДГХ1 и ДГХ2 на фоне ТПП приводило к сдвигу в направлении значений контрольной группы уровня транскриптов генов ферментов АОС, а также содержания мРНК транскрипционных факторов Nrf2 и FOXO1. ДГХ2 оказывал дополнительное стимулирующее воздействие на экспрессию генов *Sod1*, *Gpx1* и *Gsta2*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Iskusnykh, I.Y., Kryl'skii, E.D., **Brazhnikova, D.A.**, Popova, T.N., Shikhaliev, K.S., Shulgin, K.K., Matasova, L.V., Popov, S.S., Zhaglin, D.A., Zakharova, A.A. Popova, N.R., Fattakhov, N. Novel Antioxidant, Deethylated Ethoxyquin, Protects against Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Rats by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation and Apoptosis. // *Antioxidants*. 2021, V. 10, N 1. P. 122. DOI:10.3390/antiox10010122. Q1, WoS, Scopus, IF=7,6.

2. Kryl'skii, E. D., **Sinitsyna, D. A.**, Popova T. N., Shikhaliev, K.S., Medvedeva S. M., Matasova, L.V., Mittova, V. O. The new antioxidant 1-benzoyl-6-hydroxy- 2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline has a protective effect against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. // *Journal of Biomedical Research*. 2022. V. 36, N 6. P. 423-434. DOI: 10.7555/JBR.36.20220098. Q2, WoS, Scopus.

3. **Бражникова Д.А.**, Попова Т.Н., Крыльский Е.Д., Шульгин К.К., Матасова Л.В., Шихалиев Х.С., Попов С.С. Воздействие 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на интенсивность свободнорадикальных процессов и активность ферментов окислительного метаболизма при токсическом поражении у крыс. // *Биомедицинская химия*. Москва. 2019. Т. 65, № 4. С. 331-338. DOI: 10.18097/PBMC20196504331 Q4, WoS, Scopus, IF=0,2.

4. **Бражникова Д.А.**, Крыльский Е.Д., Матасова Л.В., Шульгин К.К., Веревкин А.Н., Попов С.С., Попова Т.Н. Каталитические свойства глутатионпероксидазы при токсическом поражении печени у крыс и введении 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина. //

Сорбционные и хроматографические процессы. Воронеж. 2019. Т. 19, № 4. С. 481-488. DOI: 10.17308/sorpchrom.2019.19/787. Q4, Scopus, IF=0,2.

5. **Синицына Д.А.**, Попова Т.Н., Крыльский Е.Д., Шихалиев Х.С., Лебедева Ю.И., Жеребцова Е.В., Попова Д.А. Воздействие 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на показатели оксидативного статуса и активность ферментов метаболизма дикарбоновых кислот при токсическом поражении печени у крыс. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. Москва. 2023. № 1. С. 43-48. <https://doi.org/10.29296/25877313-2023-01-08>. ВАК, IF=0,2.

Основные публикации в материалах научных конференций:

1. **Бражникова Д.А.**, Шульгин К.К., Попова Т.Н., Л. В. Матасова, В. Леал. Исследование протекторных свойств 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина при токсическом поражении печени у крыс. // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: материалы 7-й Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2018», г. Воронеж, 28-30 марта 2018 г.: Воронеж, 2018.— С. 392-395.

2. **Бражникова Д.А.**, Л. В. Матасова, К. К. Шульгин, Е. Ю. Лебедева, М. С. Бурлакова. Влияние 6-гидрокси-2,2,4 - триметил - 1,2 дигидрохинолина на активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в печени и сыворотке крови крыс с токсическим гепатитом. // *Инновационные научные исследования: теория, методология, тенденции развития*. Сборник статей по материалам международной научно-практической конференции, (8 июня 2019 г., г. Уфа): в 3 ч. — Уфа, 2019 г.— Ч. 1. – С. 27-30.

3. **Бражникова Д.А.**, Шульгин К.К., Матасова Л.В., Власова С.Н., Шведенко Е.Н. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в печени и сыворотке крови крыс с токсическим гепатитом при введении 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина. // *Вестник науки*. Сборник статей по материалам международной научно-практической конференции "Научные исследования в современном мире: опыт, проблемы и перспективы развития". Уфа, "НИЦ Вестник науки", 2019г., часть 1. — С. 31-34.

4. Жаглин Д.А., **Бражникова Д.А.**, Крыльский Е.Д., Попова Т.Н. Воздействие 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на активность каспаз при токсическом поражении печени у крыс. // *Технические и естественные науки: сборник избранных статей по материалам Международной научной конференции, Санкт-Петербург, ГНИИ "Нацразвитие"*, 2020 г. — С. 9 -11.

5. Дорохова Ю.И., **Бражникова Д.А.**, Матасова Л.В. Активность миелопероксидазы в тканях крыс при введении дигидрохинолинового производного на фоне развития токсического гепатита. // *Наука. Исследования. Практика: сборник избранных статей по материалам Международной научной конференции Science. Research. Practice, Санкт-Петербург, август 2020 г. – СПб.: ГНИИ «Нацразвитие», 2020 г. — С. 7-9.*

6. Жеребцова Е.В., **Бражникова Д.А.**, Крыльский Е.Д., Матасова Л.В. Влияние 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на функционирование СОД и каталазы при токсическом повреждении печени у крыс // *Высокие технологии и инновации в науке: сборник избранных статей Международной научной конференции, Санкт-Петербург, сентябрь 2021 г. — СПб.: ГНИИ «Нацразвитие», 2021г. — С. 17 -19.*

7. Лаврущев А.И., **Бражникова Д.А.**, Крыльский Е.Д., Матасова Л.В. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в сыворотке крови и печени крыс с токсическим гепатитом при введении 1-(6-гидрокси-2,2,4-триметил-3,4-дигидрохинолин-1-ил) этанонбензола. // *Высокие технологии и инновации в науке: сборник избранных статей Международной научной конференции, Санкт-Петербург, сентябрь 2021 г. – СПб.: ГНИИ «Нацразвитие», 2021 г. С. 20 - 22.*

8. Мигунова Д.С., **Бражникова Д.А.**, Крыльский Е.Д., Матасова Л.В. Влияние производного хинолина на активность аконитатгидратазы и содержание цитрата в печени

крыс с токсическим поражением печени // Высокие технологии и инновации в науке: сборник избранных статей Международной научной конференции, Санкт-Петербург, Сентябрь 2021). – СПб.: ГНИИ «Нацразвитие», 2021 — С. 17 - 19. Технологии и инновации в науке: сборник избранных статей Международной научной конференции, Санкт-Петербург, сентябрь 2021. — СПб.: ГНИИ «Нацразвитие», 2021 г. — С. 23 - 25.

9. Лебедева Ю.И., **Бражникова Д.А.**, Мунезеро Т., Матасова Л.В. Воздействие дигидрохинолинового производного на интенсивность свободнорадикального окисления при токсическом поражении печени у крыс. // Наука. Исследования. Практика: сборник избранных статей по материалам Международной научной конференции, Санкт-Петербург, декабрь 2021 г. — СПб.: ГНИИ «Нацразвитие», 2021 г. — С. 7-9.

10. Лаврущев А.И., **Бражникова Д.А.**, Матасова Л.В., Бородина А.В. Активность глутатионтрансферазы при введении 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на фоне токсического поражения печени у крыс. // Высокие технологии и инновации в науке: сборник избранных статей Международной научной конференции, Санкт-Петербург, ноябрь 2021 г. – СПб.: ГНИИ «Нацразвитие», 2021 г. — С. 20-22.

11. Мунезеро Т., Аксенова А.А., **Бражникова Д.А.**, Матасова Л.В. Влияние 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на экспрессию редокс-зависимых транскрипционных факторов в печени крыс при токсическом гепатите. // Наука и техника: новые вызовы современности: сборник статей VI Международной научно-практической конференции. Москва, 12 марта 2022 г. – Москва: Научный клуб «Ракета», 2022 г. — С. 7-12.

Список цитированной литературы

1. Wang R. et al., *Cell Mol Immunol.*, 2021, **18**, p. 4-17.
2. Petrasek J. et al., *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2018, **110**, p. 16544-16549.
3. Liu Y. et al., *Int J Mol Med.*, 2018, **42** (2), p. 755-768.
4. Dutta S. et al., *PLoS One.*, 2018, **13** (4): e0196411.
5. Mortezaee K. et al., *J Cell Physiol.*, 2018, **233**, p. 4015-4032.
6. Hayes J.D. et al., *Trends Biochem. Sci.*, 2009, **34** (4), p. 176-188.
7. Harris T.R. et al., *Molecular Pharmacology*, 2018, **94** (2), p. 834-841.
8. Zhan J. et al., *J Neuroinflammation.*, 2016, **13** (1), p. 258.
9. Kelley N. et al., *Int J Mol Sci.*, 2019, **20** (13), p. 3328.
10. Ma J.Q. et al., *Food Chem Toxicol.*, 2014, **64**, p. 41-48.
11. Di Costanzo, A. et al., *Molecules.*, 2019, **24** (11), p. 2155.
12. Mandel H.G. et al., *Cancer Res.*, 1987, **47** (19), p. 5218-5223.
13. Kim H.L. et al., *Am J Vet Res.*, 1982, **43** (11), 1945-1950.
14. Blaszczyk A., *Toxicol Lett.*, 2006, **163**, p. 77-83.
15. Tong W.H. et al., *Biometals.*, 2007, **20** (3-4), p. 549-564.
16. Harris T.R. et al., *Molecular Pharmacology*, 2018, **94** (2), p. 834-841.
17. Wang W.Y. et al., *Ann Transl Med.*, 2015, **3** (10), p. 136.
18. Liu Y. et al., *Int J Mol Med.*, 2018, **42** (2), p. 755-768.
19. Wang Z. et al., *Archives of Toxicology.*, 2019, **93**, p. 3585-3599.
20. Jin Y. et al., *Cell Mol Immunol.*, 2019, **17** (2020), p. 1245-1256.
21. Zheng Q. et al., *Exp Eye Res.*, 2014, **125**, p. 1-8.
22. Miao W., *Biochem Pharmacol.*, 2004, **67**, p. 1897-1905.
23. Harvey C.J., *Free Radic Biol Med.*, 2009, **46**, p. 443-453.
24. Itsumi M. et al., *Cell Death Differ.*, 2015, **22** (11), p. 1837-1845
25. Jeong T.B. et al., *J Antioxidants (Basel.)*, 2020, **9** (3), p. 201.