

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈՒԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ԼՈՒՍԻՆԵ ՀԱՄԼԵՏԻ ՄԵԼՔՈՆՅԱՆ

ԻՄՈՒՆԱԽԹԱՆԻՉՆԵՐԻ ԵՎ ԻՄՈՒՆԱԱՐԳԵԼԱԿԻՉՆԵՐԻ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅԱՆ
ՄՈՒԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԻՄԻԱԿԱՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐՆ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ
ՉՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐԻ ՑԻՏՈՔՐՈՄ b₅₅₈-ի ԻԶՈՉԵՎԵՐԻ ՎՐԱ

Գ.00.04 - «Կենսաքիմիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական
աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2014

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

МЕЛКОНЯН ЛУСИНЕ ГАМЛЕТОВНА

МОЛЕКУЛЯРНО - БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ
ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ И ИММУНОСУПРЕССОРОВ НА ИЗОФОРМЫ
ЦИТОХРОМА b₅₅₈ ТКАНЕЙ КРЫС

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.00.04 – “Биохимия”

ЕРЕВАН 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Ն. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդում

Գիտական ղեկավար՝ կ. գ. դ., պրոֆ. Մ. Ա. Միմոնյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կ. գ. դ., պրոֆ. Գ.Ա. Գևորգյան
կ. գ. դ., պրոֆ. Ն.Ն. Բարխուդարյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Մ. Հերացու անվան Երևանի պետական բժշկական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2014թ. ապրիլի 25-ին, ժամը 15⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, Փորձարարական կենսաբանության 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, 0014, ք.Երևան, Հասարթյան փ. 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և www.molbiol.sci.am կայքում:

Սեղմագիրն առավել է 2014թ. մարտի 25-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար՝ կենս. գիտ. թեկնածու



Գ.Մ.Սկրտչյան

Тема диссертации утверждена в Институте биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА

Научный руководиль: д. б. н., проф. М. А. Симонян

Официальные оппоненты: д. б. н., проф. Г.А. Геворгян
д. б. н., проф. Н.А. Бархударян

Ведущая организация: Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци

Защита диссертации состоится 25 апреля 2014г. в 15⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 042 по Экспериментальной биологии, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии НАН РА и на сайте www.molbiol.sci.am

Автореферат разослан 25 марта 2014г.

Ученый секретарь специализированного совета 042,
кандидат биол. наук



Г.М. Мкртчян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Супероксидный радикал и его производные ($^1\text{O}_2$, O_2^- , H_2O_2 , $\text{NO}\cdot$, $\text{HO}\cdot$, $-\text{ONOO}$, $\text{HOO}\cdot$), известные как активные формы кислорода (АФК), являются важными промежуточными соединениями аэробных метаболических процессов. Для аэробных организмов, включая человека и других млекопитающих, один из механизмов патогенеза связывается с нарушением физиологического равновесия между системами продуцирования и утилизации АФК и с истощением антирадикальной защитной системы. С другой стороны, АФК являются ключевыми факторами функционирования иммунной системы, в которой огромная роль придается комбинированной NADPH-оксидазе (Nox или цитохром b_{558}) [Campion Y. et al., 2009; Carrichon L. et al., 2011; El-Benna J. et al., 2008; Kikuchi H. et al., 2010; Ostuni M. et al., 2010], состоящей из компонентов gp91phox, p22phox, p40phox, p47phox и p67phox, Rac1, Rac2 [Vignais P.V., 2002; Someya A. et al., 1997; Simonyan G.M. et al., 2006].

Наряду с внутриклеточными Nox, существует и экстрацеллюлярная Nox (eNox), которая локализована в сыворотке крови человека и других млекопитающих. Уровень eNox резко повышается при асцитной карциноме различных типов как фактор развития опухолевых клеток. Впервые открыт феномен проявления eNox в крови млекопитающих (крыс, быка и человека) в результате инкубации крови в аэробных условиях *in vitro* [Симонян Г.М. и др., 2005]. Nox обладают и ферриHb-восстанавливающей активностью [Симонян Р.М. и др. 2004; Симонян Г.М. и др., 2006]. При различных патологических состояниях наблюдаются повышение или подавление активности изоформ Nox, однако механизмы непосредственного воздействия внешних факторов на активность и физико-химические показатели этих ферментов еще не определены. Не установлены также молекулярно-биохимические механизмы воздействия внешних физических агентов (облучения различного характера), ассоциированных с характерным изменением уровня и активности изоформ Nox. Определение этих показателей поможет по-новому оценить и скорректировать целесообразность применения радиотерапии различного характера.

Своеобразно изменяются компоненты иммунной и других регуляторных систем метаболизма АФК под воздействием лазерного облучения различного характера [Gulsoy M. et al., 2006; Wang Q. et al., 2012], X-облучения [Jang S.S. et al., 2009; Shin J. W. et al., 2011], ультрафиолетового облучения [Wu X. et al., 2010; Shreedhar V. et al., 1998], ультразвука [Xiao J. et al., 2004; Chakrabarti J. et al., 2001], электростимуляции [Chakrabarti J. et al., 2001; Xiao J. et al., 2004], цитокинов [Higai K. et al., 2007; Harris J. et al., 2011] и при гипоксии [Ishizuka T. et al., 2011; Vergadi E et al., 2011], вызывающих подавление [Kallenborn-Gerhardt W. et al., 2012; De Faria C.M. et al., 2012] или стимулирование активности Nox [Matsumoto J. et al., 2012; Dhiman M. et al., 2011].

С разработкой простых и комплексных методов одновременного получения из крови и других органов (органы иммунной системы) известных ключевых металлопротеинов антиоксидантной активности (МАО) и новых типов металлопротеинов (МП) прооксидантной активности (МПА - изоформы Nox и супрол) [Симонян М.А., 1995; 1997; 2001; 2006], а также их количественного и качественного определения эта проблема, в основном, решается.

Актуальность работы заключается в том, что в ней впервые комплексно определены молекулярно-биохимические механизмы оксидативного повреждения крови, селезенки, костного мозга, ассоциированные с характерными изменениями уровня и активности МПА и МАО после воздействия облучения различного характера (X-, УФО, He-Ne-

лазерное), ультразвука, электростимуляции, цитокинов, CO₂ совместно с галармином, а также широко используемого глюкокортикоида преднизолона *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*.

Цель и задачи исследования. Целью данного исследования являлось изучение молекулярно-биохимических механизмов оксидативного повреждения клеток крови, селезенки и костного мозга крыс, на основе характерных изменений уровня и активности МАА и МПА в указанных тест-объектах под воздействием некоторых внешних факторов (ВФ). Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: определение изменения уровня, NADPH-зависимой O₂⁻-продуцирующей и ферриНб-восстанавливающей активности изоформ Nox, eNox, а также O₂⁻-продуцирующей активности супрола оптически и другими методами в условиях *in vivo*, *in vitro* и *ex vivo* под влиянием следующих ВФ: He-Ne-лазерное облучение, ультрафиолетовое облучение, X-облучение, ультразвук, электростимуляция, анти- и провоспалительные цитокины, преднизолон, углекислый газ в отсутствие и присутствии галармина.

Научная новизна работы. Были выявлены характерные изменения уровня и активности МАА и МПА, которые являются механизмами оксидативного повреждения крови, клеток селезенки и костного мозга после воздействия ВФ. После электрической стимуляции супраоптических и паравентрикулярных ядер (SON и PVN) гипоталамуса наблюдается повышение уровня, NADPH-зависимой O₂⁻-продуцирующей и ферриНб-восстанавливающей активности изоформ Nox из мембран, митохондрий и ядер клеток селезенки, печени, почек, сердца и мозга. При СКЭНАР стимуляции крыс в большинстве случаев отмечаются повышение NADPH-зависимой O₂⁻-продуцирующей активности и некоторое снижение ферриНб-восстанавливающей активности изоформ этих Nox с увеличением каталазной и СОД активности клеток органов иммунной системы. Цитокины различного характера (ИФ-альфа, ФНО-альфа, ИЛ-4) действуют своеобразным путем: необратимо прилипают к приведенным Nox и eNox, вызывая адекватное увеличение или снижение NADPH-зависимой O₂⁻-продуцирующей и ферриНб-восстанавливающей активности этих ферментов *in vitro*. При интоксикации крыс двуокисью углерода, ассоциированной с кислородным голоданием, наблюдается существенное увеличение уровня, NADPH-зависимой O₂⁻-продуцирующей и ферриНб-восстанавливающей активности приведенных изоформ Nox и eNox, которые не претерпевают изменений на оптико-спектральном уровне. При этом введенный в профилактическом режиме галармин оказывает защитное действие путем дальнейшего повышения уровня Nox и приближения активность ключевых МАА к норме и, в итоге, вызывая значительное снижение гибели животных. Подавление (при X-, УФ-облучении и УЗ) и стимулирование (при He-Ne-лазерном облучении) активности иммунной системы и кислородного гомеостаза ассоциируются с соответственным снижением и увеличением NADPH-зависимой O₂⁻-продуцирующей и ферриНб-восстанавливающей активности изоформ Nox из ЭМ и МКС в гомогенной и гетерогенной фазах. Преднизолон вызывает необратимое снижение уровня и активности изоформ Nox в гомогенной и гетерогенной фазах.

Научно-практическое значение работы. Предложенный метод получения МАА и МПА из крови, клеток селезенки и костного мозга может быть использован для определения количественных характеристик оксидативного повреждения этих тканей, ассоциированных с характерными изменениями уровня и активности изоформ Nox, eNox, супрола, а также СОД и каталазы после воздействия ВФ. Диапазоны этих изменений могут быть использованы как новые и чувствительные маркеры определения допустимых границ воздействия ВФ в клинической практике. Электростимуляция гипоталамуса может быть лечебным фактором при заболеваниях различного характера, в

частности при иммунодефиците и анемии путем стимулирования активности Nox. Повышение уровня (до 4,5 раза) и NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности (до 6,4%) изоформ Nox стволовых клеток костного мозга как ключевого фактора восстановления поврежденных тканей со стимулированием пролиферации клеток электростимуляция аппаратом СКЭНАР может оказывать терапевтическое действие. Цитокины (ИФ-альфа, ФНО-альфа, ИЛ-4) могут быть использованы для повышения или снижения уровня Nox при заболеваниях, когда наблюдается снижение или повышение уровня этих ферментов. Для избежания необратимого подавления иммунной активности и кислородного гомеостаза необходим более осторожный подбор эффективных доз применяемого преднизолона. Защитный эффект галармина в профилактическом режиме при гипоксии с избытком CO_2 может быть применен в различных областях жизнедеятельности человека (подводные, подземные, орбитальные работы и т.д.).

Апробация работы. Основные результаты настоящей работы были представлены и обсуждены на семинарах и заседаниях ученого совета Института биохимии им. Г. Бунятяна НАН РА (2009-2013).

Публикации. Основные результаты настоящего исследования отражены в 6 научных работах, опубликованных как в отечественных, так и в международных изданиях.

Объем и структура работы. Работа изложена на 102 страницах, содержит 13 таблиц и 9 рисунков, состоит из списка использованных сокращений, введения, обзора литературы, описания методов, материалов и условий исследования, изложения и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 182 наименований.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Используемые методы. Для выделения и очистки металлопротеинов из эритроцитов и из клеток тканей крыс были использованы лицензированные способы [Симонян М.А. и др., 1997; Симонян Г.М. и др., 2001; 2008].

Выделение изоформ Nox из эритроцитарных мембран крыс. Процедуру получения Nox осуществляли универсальным методом с использованием ионообменной хроматографии на целлюлозах КМ-52, DE-52 [Симонян Г.М. и др., 2008]. Эритроциты из крови крыс (по 2-5 мл) осаждали добавлением к ней физраствора (1:20 мл). После центрифугирования осажденных эритроцитов (при 6000 об/мин, 5 мин) их подвергали гемолизу в воде (1:10 об/об). Эритроцитарные мембраны (ЭМ) осаждали центрифугированием гемолизата при 6000 об/мин (при pH 5,6) в течение 15 мин. Далее осажденные ЭМ повторно смешивали с водой (1:200 об/об) и после центрифугирования в аналогичных условиях осажденные ЭМ смешивали с водой (1:10) и осуществляли процесс солиubilизации суммарной фракции изоформ Nox ЭМ. После диализа против воды и центрифугирования смеси из надосадочного раствора фракцию Nox получали ионообменной хроматографией сначала на колонках с КМ-52, а затем с DE-52 целлюлозами. Из последней колонки Nox элюировали 0,2 М КФБ. После гель-фильтрации Nox на колонке с сефадексом G-100 центральная фракция имела электрофоретическую гомогенность (определяется диск-гель электрофорезом на 10% полиакриламидном геле).

Выделение изоформ Nox из мембран, митохондрий и ядер клеток тканей крыс. Метод получения Nox из компонентов клеток тканей крыс (селезенка, костный мозг, сердце, печень, почки) включает следующие процедуры : ткани (по 4 г и по 0,1 г в случае

костного мозга) промывали физиологическим раствором и взвешивали, а затем проводили гомогенизацию в 0,25 М сахарозе (1 г ткани в 10 мл сахарозы) 1 мин при 4°C. Ядра клеток осаждали центрифугированием гомогената при 3000 об/мин в течение 10 мин. Митохондрии осаждали после центрифугирования надосадочного раствора при 12000 об/мин в течение 15 мин, а после удаления ядер и митохондриальной мембраны клеток осаждали при pH 5,6 при 6000 об/мин в течение 10 мин. После промывания осадков компонентов клеток водой (1:200 об/об) и повторной гомогенизации в воде (1:10 об/об) осуществляли солюбилизацию фракций Nox. После диализа против воды и центрифугирования диализата надосадочный раствор подвергали ионообменной хроматографии на колонках с целлюлозой KM-52 и DE-52. Из последней колонки фракции Nox элюировали 0,2 М КФБ. После гель-фильтрации на сефадексе G-100 центральные фракции Nox имели электрофоретическую гомогенность. Молекулярную массу изоформ Nox определяли методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100 (сверхтонкая), используя в качестве стандартов следующие белки: цитохром С из сердца быка, Cu,Zn-СОД из печени быка, церулоплазмин и трансферрин из сыворотки плацентарной крови женщин, каталаза из печени быка. Был использован также декстран синий для определения свободного объема сефадекса.

Количество Nox определяли путем измерения плотности максимального оптического поглощения раствора Nox при 530 нм (β -полоса поглощения). Удельное содержание Nox из мембран клеток тканей определяли из расчета на 1 мл раствора Nox, полученного из 1 г ткани и 1 мл эритроцитов [Симонян Г.М. и др., 2008].

Выделение и очистка экстрацеллюлярной NADPH-оксидазы из сыворотки крови млекопитающих. Экстрацеллюлярную NADPH оксидазу (eNox) выделяли следующей процедурой: после инкубирования очищенной от следов эритроцитов и плазменных клеток сыворотки в течение 4 суток при 4°C подвергали диализу против воды. После центрифугирования диализата (6000 об/мин, 10 мин) и удаления из него липопroteина высокой плотности – супрола, повторным центрифугированием фракцию экстрацеллюлярной Nox выделяли ионообменной хроматографией надосадочного раствора на колонке с сефадексом DEAE A-50 и элюированием 0,04 М КФБ. После разбавления элюата водой (30 раз) и ионообменной хроматографии на колонке с целлюлозой DE-52 фракцию eNox элюировали 0,04 М КФБ. Путем гель-фильтрации Nox на колонке с сефадексом G100, центральная фракция имела электрофоретически гомогенное состояние [Симонян М.А. и др., 1997]

Определение NADPH-зависимой O₂-продуцирующей активности Nox. NADPH-зависимую O₂-продуцирующую активность изоформ Nox определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом путем вычисления процента стимулирования образования формазана при 560 нм, в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу NADPH-зависимой O₂-продуцирующей активности Nox принимали количество белка, которое стимулирует образование формазана на 50%. Удельная супероксидпродуцирующая активность Nox была определена в расчете на 1 г ткани, 1 мл эритроцитов и 1 мл сыворотки.

Определение ферриНв-восстанавливающей активности Nox. ФерриНв-восстанавливающую активность изоформ Nox определяли, используя ферриНв цитоплазмы эритроцитов крыс с величиной плотности максимального оптического поглощения (при 565 нм), равной 0,8. Непосредственно в кварцевых кюветках спектрофотометра к 2,5 мл раствору ферриНв добавляли 0,2 мл Nox с плотностью максимального оптического поглощения при 530 нм (A_{530}) = 0,3. После перемешивания реакционной смеси ее инкубировали в аэробных условиях в течение 15-16 ч при 30°C.

Далее, после повторного перемешивания реакционной смеси, определяли кинетику восстановления ферриНв до ферроНв путем измерения снижения плотности α -полосы поглощения ферриНв (такое снижение прямо пропорционально образовавшемуся ферриНв, который имеет максимальное поглощение при 555 нм). За единицу ферриНв-восстанавливающей активности Nox принимали количество белка, вызывающего снижение плотности максимального оптического поглощения α -полосы ферриНв до 0,05 в течение часа при 30°C. Удельная ферриНв-восстанавливающая активность Nox была определена в расчете на 1 г ткани, 1 мл эритроцитов и 1 мл сыворотки.

Выделение фракции СОД1 и каталазы из цитозоля эритроцитов крыс. Суммарную фракцию СОД1 (Cu,Zn-СОД) и каталазы из цитозоля эритроцитов выделяли после центрифугирования гемолизата эритроцитов при рН 5,6 диализа против воды, центрифугирования и ионообменной хроматографии супернатанта на колонке с целлюлозой ДЕ-52, из которой суммарную фракцию СОД1 и каталазы элюировали 0,04 М КФБ [Симонян М.А. и др., 1997].

Выделение суммарной фракции СОД1, СОД2 и каталазы из цитозоля клеток селезенки крыс. Суммарную фракцию СОД1, СОД2 (Mn-СОД) и каталазы из цитозоля селезенки выделяли после диализа последней против воды, центрифугирования и ионообменной хроматографии супернатанта на целлюлозе ДЕ-52 и элюирования этой фракции 0,1 М КФБ [Симонян М.А. и др., 1997].

СОД активность фракций устанавливали НТС методом путем определения процента снижения плотности максимального оптического поглощения формазана (при 560 нм), который образуется в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу СОД активности принимали количество фракции, которое вызывает 50% снижение. Удельная активность СОД была определена в расчете на 1 мл эритроцитов и 1 г ткани.

Каталазную активность фракций определяли перганометрическим титрованием раствора H_2O_2 в присутствии или в отсутствие определенного количества каталазы. За единицу каталазной активности принимали количество фракции, расщепляющее 0,1 М H_2O_2 в течение 1 мин при 20°.

Выделение фракции супрола из сыворотки крови крыс и его активирование *in vitro*. Фракции супрола из сыворотки крови животных выделяли по методу Симоняна Г.М. и др. (1999). В частности, отдиализованную против воды сыворотку подвергали ионообменной хроматографии на ДЕ-52 целлюлозе, уравновешенной 0,005 М КФБ, рН 7,4. Неактивный супрол не осаждается на этой колонке. Очищенную от следов церулоплазмينا, трансферрина фракцию неактивного супрола активировали (для продуцирования O_2^-) присоединением ионов Fe^{+3} (5×10^{-7} М). Следы неприсоединившихся к белку ионов железа удаляли пропусканьем белка через колонку с ДЕ-52 целлюлозой.

Используемые материалы. Для выделения и очистки металлопротеинов крови и клеток тканей млекопитающих были использованы целлюлозы ДЕ-52, КМ-52 («Whatman», Англия), сефадексы DEAE А-50 и G-100 («Pharmacia», Швеция).

Для определения супероксиддисмутазной или O_2^- -продуцирующей активности Nox и супрола были использованы НТС, феназин метасульфат, пирофосфат натрия, динатриевая или тетранатриевая соль NADPH. Для определения каталазной активности использовали перекись водорода и перманганат калия. Для приготовления буферных растворов были использованы одно- и двухзамещенный фосфат калия (марки «чистый для анализа»). Для изменения рН растворов была использована соляная кислота.

Электрофорез белков был осуществлен на приборе венгерского производства с соответствующими реактивами и приспособлениями. Остальные реактивы (натрий

хлористый, NaOH, KOH и др.) также были марки “чистый для анализа. Используемый преднизолон - фирмы «Sigma», США.

Используемые приборы. Для проведения ионообменной хроматографии были использованы стеклянные колонки со стеклянными фильтрами размерами: 4×30 см, 2×20 см, 1×15 см, а для гель-фильтрации: 3×90 см и 2×70 см. В процессе очистки эритроцитарных мембран, ядер, митохондрий и мембран клеток тканей были использованы центрифуги K-24 и K-70 («Veb MLW Zentrifugenbaum Engelsdorf», Германия).

Статистическая обработка полученных результатов была осуществлена общеизвестным методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности «р».

Оптические измерения проводили на спектрофотометре «Specord UV/VIS» (Германия), с длиной оптического пути 1 см при комнатной температуре.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Повышение уровня, NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриНв-восстанавливающей активности изоформ Nox из мембран, митохондрий и ядер клеток органов крыс после электрической стимуляции супраоптических и паравентрикулярных ядер гипоталамуса

Была использована билатеральная электрическая стимуляция прямоугольным током длительностью 0,5 мс, амплитудой 0,12-0,16 mA, частотой 100 Гц, продолжительностью 1 сек. После электростимуляции SON и PVN гипоталамуса эндогенный уровень и активность Nox из клеточных компонентов повышаются неадекватным образом (табл. 1,2). Фактически, к электростимуляции очень чувствительны клетки селезенки и сравнительно малочувствительны ядра и митохондрии клеток почек, митохондрии клеток печени и мембраны клеток почек.

Таблица 1

Относительное изменение (%) роста NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности фракций изоформ Nox из клеточных компонентов органов крыс после электрической стимуляции гипоталамуса крыс по сравнению со 100% контрольными показателями (в отсутствие электростимуляции), n = 6, p < 0,05

Органы	Ядра	Митохондрии	Мембраны клеток
Селезенка	146,8±39,1 (p<0,01)	352,9±44,3 (p<0,05)	1040,8±110,5 (p<0,05)
Печень	230,9±53,4 (p<0,001)	5,8±1,6 (p<0,05)	505,7±71,8 (p<0,01)
Почки	15,4±2,2 (p<0,001)	7,3±0,9 (p<0,01)	16,2±2,2 (p<0,05)
Сердце	35,6±4,8 (p<0,01)	105,3±14,2 (p<0,05)	53,8±6,3 (p<0,001)
Мозг	67,8±5,1(p<0,05)	300,4±55,1 (p<0,01)	125,7±21,5 (p<0,001)

Таблица 2

Относительное изменение (%) роста эндогенного уровня фракций изоформ Nox кислого характера из клеточных компонентов органов крыс после электрической стимуляции гипоталамуса крыс, по сравнению со 100% контрольными показателями (в отсутствие электростимуляции), $n = 6, p < 0,05$

Органы	Ядра	Митохондрии	Мембраны клеток
Селезенка	55,3±6,1 (29,4±3,7)	27,4±4,2 (19,3±2,8)	61,4±15,9 (35,3±3,0)
Печень	15,1±1,9 (8,4±1,1)	15,3±2,4 (9,4±0,3)	7,1±0,4 (5,9±0,4)
Почки	21,3±2,0 (9,9±1,7)	19,4±2,2 (12,5±1,9)	33,4±4,2 (26,1±4,0)
Сердце	41,3±5,1 (19,8±4,1)	17,0±3,3 (9,1±0,3)	41,4±4,3 (27,5±4,4)
Мозг	22,0±3,1 (12,4±1,1)	15,2±3,0 (6,4±0,3)	38,1±5,5 (29,7±4,6)

Примечание: в скобках показаны изменения ферриНв-восстанавливающей активности изоформ Nox.

Очевидно, что механизм повышения иммунореактивности гипоталамуса после электрической стимуляции ассоциирован с повышением уровня изоформ Nox в клеточных компонентах, в первую очередь, в клетках органа иммунной системы – селезенки. Из приведенных данных можно сделать вывод, что: 1) гипоталамические нейропептиды имеют отношение к функции ядра (вероятно, путем взаимодействия с геномом) [Jimenez-Vasquez P.A. et al., 2000]; 2) нейросекреторные ядра гипоталамуса принимают участие в продуцировании O_2^- клетками органов иммунной системы; 3) за счет регулирования (повышения) уровня Nox в митохондриях гипоталамус может принимать участие в образовании макроэргов дыхательной цепи митохондрий; 4) исходя из того, что изоформы Nox обладают также ферриНв-восстанавливающей активностью [Симонян Г.М. и др., 2007], можно констатировать, что гипоталамус участвует и в процессе регулирования кислородного гомеостаза.

2. Уровень и активность анти- и прооксидантных металлопротеинов после СКЭНАР - стимуляции у крыс

СКЭНАР - стимуляцию (самоконтролируемый энергонеуроадаптивный регулятор) крыс осуществляли в течение 1 мин на задние лапы (общерегуляторные зоны) и в течение 30 сек на ушную раковину (уровень тока 90, интенсивность 3, Z 30). СКЭНАР-терапия оказывает положительное действие при лечении диабетической ретинопатии, атрофии зрительного нерва и нейросенсорной тугоухости [Арутюнян Р.Р. и др., 2008]. К настоящему времени молекулярно-биохимические механизмы воздействия СКЭНАР - терапии еще не выявлены. Через 1-1,5 ч после воздействия СКЭНАР начинается постепенное пробуждение крыс от сонливости. На этом этапе уровень и активность антиоксидантных и прооксидантных металлопротеинов претерпевают неоднозначные изменения (табл. 3, 4). При СКЭНАР-стимуляции наблюдается резкое повышение (до 4,5 раза) уровня фракции изоформы Nox из клеток костного мозга. С другой стороны, повышение уровня, а также NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности изоформ Nox в стволовых клетках костного мозга свидетельствуют о стимулирующем действии этих клеток (последние являются факторами модуляции иммунной системы и восстановления поврежденных тканей путем стимулирования пролиферации клеток). Снижение уровня фракции изоформ Nox из ЭМ, возможно, связано с повышением стабильности ЭМ и МКС, что может снизить процесс рилинга Nox из ЭМ и МКС. Фактически, СКЭНАР-стимуляция в приведенном режиме

отрицательно влияет только на митохондрии клеток селезенки, снижая уровень и NADPH-зависимую O_2^- -продуцирующую активность изоформ Nox в этих субклеточных формированиях. Видимо, и этот эффект оставляет свой отпечаток в процессе сонливости крыс под влиянием СКЭНАР-стимуляции путем снижения интенсивности окислительно-восстановительных энергообразующих процессов с участием O_2^- в дыхательной цепи митохондрий (табл. 3).

Таблица 3

Изменение уровня (A_{530} нм), NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности изоформ Nox из тканей и субклеточных образований крыс до (К) и после электрической стимуляции (ОП), n=8, p<0.05

Nox из:	A_{530} нм		NADPH-завис. O_2^- -продуцир. активность		ФерриHb-восстанавл. активность	
	К	ОП	К	ОП	К	ОП
Сыворотки крови	0,15±0.02 (p<0.01)	0,16±0.01	25,1±4.3	40.9±4.0 (p<0.03)	14.6±2.5	11.5±1.3
Мембраны эритроцитов	0.42±0.04	0.26±0.05	12,9±2.3	19.6±2.2	10,7±1,1	9.5±0.2
Мембран клеток селезенки	0.64±0.05 (p<0.001)	0.25±0.04	14.1±1.8	25,3±4.1	8.6±0.3	5.8±0.3 (p<0.001)
Ядер клеток селезенки	0.71±0.06	0.80±0.06	12.2±1.4	17.7±4.0	10.1±1.1	7.3±0.1
Митохондрий клеток селезенки	0.18±0,04	0.14±0.01	8.7±0.2	6.6±0.1	7.9±0.3	5.6±0.2
Костного мозга	0.84±0.4 (p<0.03)	4.5±0.3	22.3±4.1 (p<0.01)	27.0±6.5 (p<0.01)	12.3±1.2	8.8±0.3
Супрола	0.4±0.01	0.46±0.05 (p<0.001)	17.9±3.1 (p<0.02)	10.5±1.0	-	-

Таблица 4

Изменения СОД и каталазной активности клеток тканей интактных (К) и подопытных крыс после СКЭНАР-стимуляции (ОП), n=8, p<0.05

Фракция из:	СОД активность		Каталазная активность	
	К	ОП	К	ОП
Эритроцитов	301.0±24.5 (p<0.03)	755.2±29.1	2100.0±193.5	3360.0±102.3 (p<0.03)
Селезенки	210.0±21.3 (p<0.01)	229.7±21,9	430.0±31.3	633.8±51.5 (p<0.01)
Костного мозга	180.6±18.6	225.7±41.9 (p<0.001)	195.0±14.3 (p<0.001)	257.2±44.6

Временная потеря подвижности в результате СКЭНАР-стимуляции, видимо, связана с ослаблением интенсивности дыхания из-за снижения ферриНв-восстанавливающей активности изоформ Nox из приведенных тканей и крови. В клетках костного мозга и селезенки наблюдается изменение уровня и активности МПА, которое происходит на фоне резкого увеличения Cu,Zn-СОД и каталазной активности цитозоля эритроцитов, а также некоторого повышения суммарной активности Cu,Zn-СОД и Mn-СОД. Значительное повышение СОД и каталазной активности в клетках тканей крыс под влиянием ЭС является аутоиммунным ответом адаптационных систем этих тканей против повышенного уровня O₂⁻, ферментативная дисмутация которых приводит к накоплению H₂O₂ (вследствие чего повышается активность каталазы)(табл.4).

Действие СКЭНАР-стимуляции на уровень и активность МАА и МПА у интактных крыс приводит к характерному повышению прооксидантного статуса. Возможно, при различных патологических состояниях, действуя этим механизмом, ЭС аппаратом СКЭНАР, повышая уровень и активность МАА и МПА, можно стимулировать аэробные метаболические процессы клеток органов иммунной системы (костный мозг, селезенка, а также эритроциты) с участием АФК и вызывать терапевтический эффект. Из приведенных данных особое значение имеет увеличение уровня (до 4,5 раз) и NADPH-зависимой O₂⁻-продуцирующей активности (до 6,4%) изоформ Nox из стволовых клеток костного мозга, как ключевого фактора восстановления поврежденных тканей со стимулированием их пролиферации.

3. Изменение цитокинами оптических свойств, супероксидпродуцирующей и ферриНв-восстанавливающей активности изоформ NADPH-оксидазы крыс *in vitro*

Электрофоретически гомогенные препараты изоформ Nox из МКС, МККМ, ЭМ, а также из сыворотки крови крыс (eNox) по 5 мл, с A₅₃₀ = 0,25 инкубировали с цитокинами (ФНО-альфа, ИЛ-4, ИЛ-альфа) по 0,1 мкг в течение трех часов при 36°C (опытные пробы). Контрольные пробы Nox инкубировали в аналогичном режиме, в отсутствие цитокинов. При этом наблюдается неадекватное изменение NADPH-зависимой O₂⁻-продуцирующей и ферриНв-восстанавливающей активности изоформ этих Nox *in vitro* (табл. 5).

Таблица 5

NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая активность изоформ Nox кислот природы из МКС, МККМ, ЭМ, а также из сыворотки крови крыс после 3 ч инкубирования при 36° С этих ферментов с цитокинами (ИФ-альфа, ФНО-альфа, ИЛ-4) *in vitro*, n=6, p< 0,05

Nox из:	К	+ИФ-альфа	+ФНО- альфа	+ИЛ-4
ЭМ	13,1±0,3	15,6 ±4 (p<0,03)	16,3 ±1,3 p<0,03)	15,7 ± 1,2
МКС	14,9 ± 1,2	11,2 ± 0,2	20,3 ±1,8 (p<0.01)	17,3 ±2,4 (p<0,01)
МККМ	17,5 ± 2,0	20,3±1,8 (p<0.001)	23,2 ± 2,2 (p<0.02)	19,1 ± 20,8
Сыворотки крови	25,1 ± 3,8	20,1 ±1,7	26,3 ± 2,0	25,8 ± 2,4

Эти показатели, полученные в условиях *in vitro* хорошо коррелируют с литературными данными, полученными *in vivo*. При этом, ИФ-альфа несколько подавляет ферриHb-восстанавливающую активность NADPH оксидазы из ЭМ, МКС и сыворотки и повышает ее у NADPH оксидазы из МККМ (табл. 6).

Таблица 6

ФерриHb-восстанавливающая активность изоформ Nox из МКС, МККМ, ЭМ, а также из сыворотки крови крыс после 3 ч инкубирования при 36° С этих ферментов с цитокинами (ИФ-а, ФНО-а, ИЛ-4) *in vitro*, n=6, p< 0,05

Nox из:	К	+ ИФ-а	+ФНО-а	+ИЛ-4
ЭМ	10,7 ± 0,4 (p<0,01)	9,2 ± 0,3 (p<0,01)	7,1 ± 0,2	9,8 ± 0,3
МКС	8,6 ± 0,2	6,8 ± 0,2 (p<0,03)	8,9 ±0,5 (p<0,01)	8,2 ± 0,4
МККМ	12,3 ± 1,1	10,3 ± 0,3	16,1 ± 2,6	14,8 ± 1,7
Сыворотки крови	14,6 ± 1,3	12,0 ± 0,5 (p<0,001)	14,3 ± ,2	15,1 ± 1,6

Инкубирование этих цитокинов с приведенными изоформами Nox *in vitro* вызывает определенные изменения формы и интенсивности оптических спектров поглощений этих ферментов. Под влиянием ИФ-альфа в приведенных условиях наблюдается явление неполного восстановления Fe^{+3} гемовой группы Nox из МККМ, как это имеет место под влиянием дитионита натрия (рис. 1 - а,б).

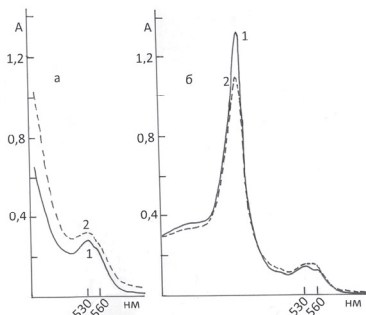


Рис. 1

Оптические поглощения электрофоретически гомогенной Nox из МККМ крыс: а - до (1) и после (2) инкубирования (3 ч при 36°) этой Nox с 0,1 мкг ИФ-альфа; б - оптические поглощения этой Nox до (1) и после (2) ее восстановления дитионитом натрия

ИФ-альфа своеобразно изменяет форму и интенсивность приведенных Nox (рис. 2 - а, б, в): из ЭМ (наблюдается повышение фона базовой линии спектра как результата потери растворимости или повышения степени самоагрегации этого фермента); из сыворотки крови (снижается поглощение Core при 412 нм с появлением слабого поглощения при 558 нм, что может быть связано с явлением незначительного восстановления ионов железа в гемовой группе этого фермента); из МКС (снижается интенсивность характерного максимального оптического поглощения при 560 и 530 нм).

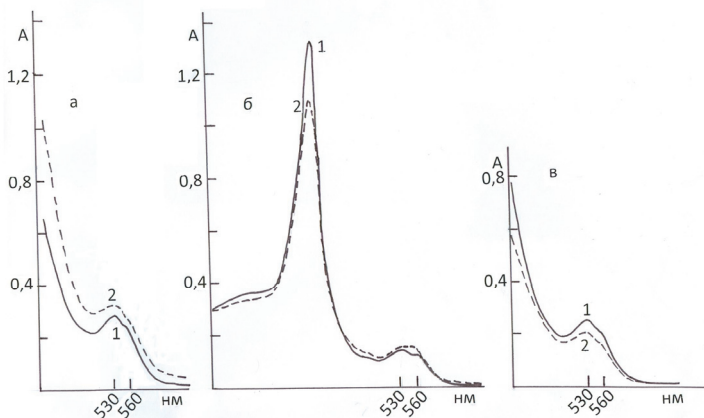
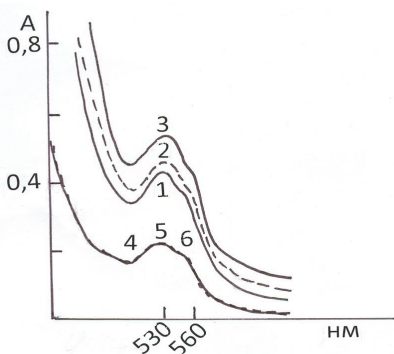


Рис. 2

Оптические поглощения электрофоретически гомогенных изоформ Nox:

а-выделенной из ЭМ до (1) и после (2) инкубирования с ИФ-альфа в приведенном режиме; б- спектры поглощения электрофоретически гомогенной Nox из сыворотки крови (eNox) до (1) и после (2) инкубирования с ИФ-альфа в приведенном режиме; в- оптические поглощения электрофоретически гомогенной Nox из МКС до (1) и после (2) инкубирования с ИФ-альфа в приведенном режиме

ФНО-альфа и ИЛ-4 действуют практически одинаково, вызывая потерю растворимости NADPH оксидазы из ЭМ, мембран клеток селезенки (МКС) и МККМ, со стимулированием процесса различной степени самоагрегации этих Nox (рис. 3-1,3).

Рис. 3

Оптические поглощения изоформ электрофоретически гомогенной Nox: из ЭМ или МКС или МКМ до инкубирования с ИЛ-4 или ФНО-альфа (по 0,1 мкг), до (1) и после их инкубирования в приведенном режиме в отдельности с ИЛ-4 (2) и с ФНО-альфа (3) до и после воздействия этих цитокинов с eNox (4-6)

При этом форма и интенсивность eNox не изменяются (рис. 3 - 4,5,6). ФНО-альфа и ИЛ-4 не влияют на NADPH-зависимую O_2^- -продуцирующую и ферриНб-восстанавливающую активность eNox в отличие от ИФ-альфа. После инкубирования приведенных изоформ Nox с ИФ-альфа, ФНО-альфа и ИЛ-4 представленные оптические спектральные изменения носят необратимый характер. С целью удаления следов этих цитокинов был использован метод ионообменной хроматографии на колонках с целлюлозой ДЕ-52. Было показано, что в подавляющем большинстве наблюдается 15-20% потеря количества приведенных Nox. Исходя из этого, можно констатировать, что указанные цитокины имеют способность необратимого прилипания к молекулам Nox, и эта связь не расщепляется ионообменной хроматографией на целлюлозе ДЕ-52 (видимо, прилипающие цитокины несколько изменяют кислотно-основные характеристики этих ферментов, изменяя условия абсорбции и десорбции NADPH на колонке с целлюлозой ДЕ-52).

4. Защитная роль гипоталамического обогащенного пролином пептида при острой интоксикации крыс двуокисью углерода в условиях кислородного голодания

При интоксикации белых крыс двуокисью кислорода, ассоциированной кислородным голоданием животных (12 животных массой 230-250 г) помещали в камеру (с верхним отверстием), куда подавался CO_2 при давлении 20 мм ртутного столба (Hg). Крысы были разделены на 3 группы – контрольную (К) и две подопытные (I, II) по 6 крыс в каждой. Животным опытной группы I (ОГ-I) внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл физиологического раствора за час до подачи CO_2 . Животным ОГ-II (они были отмечены черными пятнами) также внутрибрюшинно вводили галармин (в 0,5 мл физраствора) в профилактическом режиме (по 20 мкг/кг массы животного) за час до подачи CO_2 . Подача CO_2 продолжалась в течение 95-100 мин. Контрольным крысам вводили 0,5 мл физраствора в аналогичном режиме без подачи углекислого газа. В другой серии опытов галармин подавали в приведенном режиме, однако продолжительность подачи CO_2 увеличивали до 120-125 мин. Увеличение NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриНб-восстанавливающей активности Nox из ЭМ, клеток селезенки, костного мозга и сыворотки (eNox) под влиянием галармина ассоциированной с кислородным голоданием, связано с существенным повышением уровня изоформ Nox, практически не вызывая изменения оптических свойств этих ферментов (рис. 4,5). Одновременно галармин оказывает протекторный эффект путем дополнительного повышения уровня

Nox и приближения активности про- и антиоксидантных металлопротеинов к норме (табл.7-11). В итоге значительно снижается число погибших животных. В результате подачи CO₂ в приведенных условиях в течение 120-125 мин гибель животных составляла 62,5±2,8% (p<0,02), что свидетельствует об интоксикации крыс CO₂, ассоциированной с острым кислородным голоданием. При этом галармин оказывает защитную роль, снижая гибель животных до 13,1±1,8% (p<0,05). Полученные результаты являются основанием для применения галармина в профилактическом режиме, особенно, в критических ситуациях, когда имеется угроза кислородного голодания с повышением уровня двуокиси углерода.

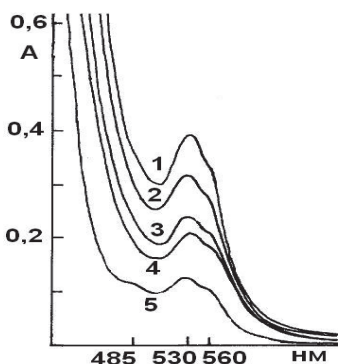


Рис. 4

Оптические поглощения фракций Nox (в окисленном состоянии) до и после воздействия CO₂, ассоциированного с кислородным голоданием: из МККМ (1); МКС (2); ЭМ (3); ЯКС (4) и из сыворотки крови (eNox) (5). В отдельности спектры контрольных проб Nox не приводятся, так как изменение формы и максимумов оптических поглощений у контрольных и опытных (после воздействия CO₂) проб Nox не наблюдается. Nox растворены в 0,2 М КФБ

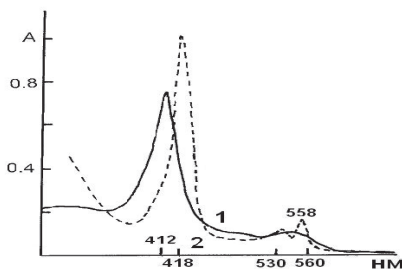


Рис. 5

Оптические поглощения фракций Nox (на примере eNox) в окисленном (1) и в восстановленном дитионитом натрия состояниях (2) до и после воздействия CO₂, ассоциированного с кислородным голоданием. Nox растворены в 0,2 М КФБ.

Характерное максимальное оптическое поглощение для Nox при 558 нм в восстановленном состоянии наблюдается и у Nox из МККМ, МКС, ЭМ и ЯКС до и после воздействия CO₂.

Таблица 7

Изменение удельного содержания (плотности максимального оптического поглощения при 530 нм) Nox из различных источников контрольных крыс (К), у крыс после их интоксикации двуокисью углерода в условиях кислородного голодания (ОГ-I) и у крыс после внутрибрюшинного введения галармина за час до подачи двуокиси углерода (20 мм Hg) в течение 95-100 мин (ОГ-II), n = 6, p<0,05

Источники Nox из:	К	ОГ-I	ОГ-II
ЭМ	1.20 ± 0.08 (p=0,03)	1.37 ± 0.11 (p=0,03)	1.45 ± 0.1 (p=0,03)
МККМ	0.8 ± 0.1 (p=0,04)	0.97 ± 0.04 (p=0,04)	1.22 ± 0.12 (p=0,04)
МКС	1.40 ± 0.06 (p = 0.005)	2.62 ± 0.11 (p=0,002)	4.54 ± 0.21 (p=0.003)
ЯКС	0.71 ± 0.05 (p=0,03)	1.32 ± 0.08 (p=0,04)	1.66 ± 0.2 (p=0,03)
Сыворотки крови	0.14 ± 0.03 (p=0,04)	0.19 ± 0.02 (p=0.04)	0.08 ± 0.01 (p=0,04)

Таблица 8

Изменение удельной NADPH-зависимой O₂⁻-продуцирующей активности Nox из различных источников у контрольных крыс (К), у крыс после их интоксикации двуокисью углерода в условиях кислородного голодания (ОГ-I) и у крыс после внутрибрюшинного введения галармина за час до подачи двуокиси углерода (20 мм Hg) в течение 95-100 мин (ОГ-II), n=6, p<0,03

Nox из:	К	ОГ-I	ОГ-II
ЭМ	12.9 ± 1.1 (p=0.02)	14.3 ± 1.0 (p=0.01)	14.8 ± 2.1 (p=0,01)
МККМ	22.3 ± 3.1 (p=0,02)	25.1 ± 3.6 (p=0,02)	26.1 ± 3,2 (p=0,02)
МКС	14.1 ± 1,7 (p=0,03)	15.7 ± 1,5 (p=0,02)	16.3 ± 2.0 (p=0,02)
ЯКС	12.2 ± 1.0 (p=0,02)	13.9 ± 2.2 (p=0,02)	14.4 ± 2.0 (p=0,01)
Сыворотки крови	25.5 ± 2,9 (p=0,01)	27.8 ± 3.7 (p=0,02)	29.9 ± 4.5 (p=0,01)

Таблица 9

Изменение удельной ферриНв-восстанавливающей активности Nox из различных источников у контрольных крыс (К), у крыс после их интоксикации двуокисью углерода в условиях кислородного голодания (ОГ-I) и у крыс после внутрибрюшинного введения галармина за час до подачи двуокиси углерода (20 мм Hg) в течение 95-100 мин (ОГ-II), n=6, p<0,05

Источники Nox из:	К	ОГ-I	ОГ-II
ЭМ	10.7 ± 0.5 (p=0,02)	8.8 ± 0.7 (p=0,02)	9.8 ± 1.0 (p=0,01)
МККМ	12.3 ± 1.3 (p=0,01)	11.2 ± 1.2 (p=0,01)	11.8 +/- 0.7 (p=0,02)
МКС	8.6 ± 0.4 (p=0,04)	7.3 ± 0.2 (p=0,03)	7.9 ± 0.5 (p=0,04)
ЯКС	10.1 ± 1.0 (p=0,03)	9.4 ± 0.4 (p=0,04)	10,0 ± 0.3 (p=0,04)
Сыворотки крови	14.6 ± 1.6 (p=0,03)	10.4 ± 0.1 (p=0,03)	13.6 ± 2.2 (p=0,04)

Таблица 10

Изменение удельной активности фракции СОД из различных источников у контрольных крыс (К), у крыс после их интоксикации двуокисью углерода в условиях кислородного голодания (ОГ-I) и у крыс после внутрибрюшинного введения галармина за час до подачи двуокиси углерода (20 мм Hg) в течение 95-100 мин (ОГ-II), n=6, p<0,02

Источники	К	ОГ-I	ОГ-II
Цитозоль эритроцитов	295.3 ± 21.9 (p=0.01)	308.0 ± 26.3 (p=0,01)	262.5 ± 18.1 (p=0.01)
Цитозоль селезенки	210.0 ± 16.3 (p=0,005)	177.9 ± 21.9 (p=0,005)	202.0 ± 30.7 (p=0,05)

Таблица 11

Изменение удельной активности фракции каталазы из различных источников у контрольных крыс (К), у крыс после их интоксикации двуокисью углерода в условиях кислородного голодания (ОГ-I) и у крыс после внутрибрюшинного введения галармина за час до подачи двуокиси углерода (20 мм Hg) в течение 95-100 мин (ОГ-II), n=6, p<0,05

Источники	К	ОГ-I	ОГ-II
Цитозоль эритроцитов	2130 ± 109.3 (p=0,03)	1320 ± 67.4 (p=0,03)	2100 ± 110.5 (p=0,03)
Цитозоль селезенки	430,6 ± 49.1 (p=0,04)	165,8 ± 19.3 (p=0,04)	420.6 ± 37.9 (p=0,04)

5. Изменения NADPH-зависимой супероксидпродуцирующей и ферриНв-восстанавливающей активности Nox из мембран клеток селезенки и эритроцитов, индуцированные излучением различной природы и ультразвуком

В I-й серии экспериментов образцы Nox, ЭМ и МКС подвергали облучению X-лучами дозой 3,5 и 5,25 Гр. X-облучение осуществляли на установке РУМ-1 (СССР), с фильтрами меди и алюминия – 0,5 мм при 20°.

Во II-й серии образцы Nox, ЭМ и МКС подвергали УФ облучению (на установке “Нановиа”, США) при 320-390 нм, с дозой облучения 100 мВ/см² и экспозицией 15 мин при 20°.

В III-й серии образцы Nox, ЭМ и МКС подвергали воздействию ультразвука с частотой 17 кГц и продолжительностью 45 сек при 20°.

В IV-й серии образцы Nox, ЭМ и МКС подвергали He-Ne-лазерному облучению с параметрами: длина волны - 632,8 нм, мощность излучения - 1,1 мВт, плотность излучения - 3 мВт/см², энергия облучения - 66 Дж, время облучения - 10 мин, режим непрерывный. Контрольные образцы Nox из ЭМ и МКС, а также ЭМ и МКС облучению и воздействию ультразвука не подвергались. Степень агрегации (степень потери растворимости) Nox в растворе при pH 7,4 определяли путем измерения интенсивности оптического поглощения Nox (цит b₅₅₈) при 530 нм в надосадочном растворе после облучения и воздействия ультразвука.

Изменение уровня, NADPH-зависимой O₂⁻-продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности изоформ Nox после X-, УФ- и He-Ne-лазерного облучения и УЗ *in vitro*, *ex vivo* приведены в табл.12.

Таблица 12

Относительное изменение (%) уровня, NADPH-зависимой O₂⁻-продуцирующей и метHb-восстанавливающей активности Nox из МКС и ЭМ *in vitro* и в МКС и ЭМ *ex vivo* после их X-, УФ-, He-Ne-лазерного облучения и УЗ по сравнению со 100% контрольными показателями (полученные без облучения этих тест-объектов), n = 6, p < 0,05

А

Показатели Nox	X-облучение	УФ-облучение	УЗ	He-Ne-лазерное облучение
1	2	3	4	5
NADPH-зависимая O ₂ ⁻ -продуц. активн. Nox из ЭМ	-26,7±4,3 (p<0,03)	-11,6 ± 4,1	-19,3 ± 1,8	+5,4 ± 0,3
NADPH-зависимая O ₂ ⁻ -продуц. активн. Nox в ЭМ	-34,2 ± 3,9	-19,4 ± 2,0	-28,3±2,9 (p<0,01)	+14,2 ± 1,1
NADPH-зависимая O ₂ ⁻ -продуц. активн. Nox из МКС	-31,3 ± 2,9	-24,1±4,0 (p<0,03)	-30, 2± 3,1	+24,9 ± 3,5
NADPH-зависимая O ₂ ⁻ -продуц. активн. Nox в МКС	-69,5±4,4 (p<0,03)	-38,9 ± 5,1	-45,3±3,8 (p<0,01)	+40,5±6,1 (p<0,03)
ФерриHb-восстанавл. активн. Nox из ЭМ	-18,3 ± 2,9	-21,8 ± 2,3	-44,8 ± 5,1	+59,2±4,3 (p<0,03)
ФерриHb-восстанавл. активн. Nox в ЭМ	-41,4±3,6 (p<0,01)	-29,8 ± 3,1	-56,3±4,0 (p<0,01)	+67,3 ± 5,7
ФерриHb-восстанавл. активн. Nox из МКС	-22,9±1,8 (p<0,03)	-16,3±1,7 (p<0,03)	-55,3 ± 4,2	+28,5±3,7 (p<0,01)
ФерриHb-восстанавл. активн. Nox в МКС	-56,4 ± 3,1	-18,1±4,1 (p<0,03)	-64,7 ± 5,3	+38,9±7,1 (p<0,03)

Б

1	2	3	4	5
Степень агрегации Nox в ЭМ	+28,5 ± 3,5	+20,3 ± 1,8 (p<0,01)	+14,4 ± 2,1	нет изменений
Степень агрегации Nox в МКС	+37,5 ± 3,3 (p<0,03)	+27,4 ± 3,1	+16,1 ± 2,3 (p<0,01)	нет изменений
A ₅₃₀ Nox из ЭМ <i>in vitro</i>	-28,3 ± 3,9 (p<0,03)	-19,7 ± 3,1	-22,5 ± 2,2	нет изменений
A ₅₃₀ Nox из МКС <i>in vitro</i>	-41,3 ± 5,2		-26,1 ± 2,7	нет изменений

Денатурирующие эффекты X-, УФ-облучений и УЗ ассоциированы с повышением уровня перекиси водорода, образованной в результате радиоллиза и фотолиза водной среды *in vitro*, *ex vivo*. При этом стимулирование ПОЛ в ЭМ и МКС как при УФ-, так и при X-облучении повышает процесс необратимой агрегации Nox в ЭМ и МКС, вызывая снижение текучести ЭМ и МКС, и понижение степени рилизинга Nox из ЭМ. При этом наблюдается подавление NADPH-зависимой O₂⁻-продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности этих Nox. Под влиянием УЗ ЭМ и МКС *ex vivo* происходит стимулирование (на 55-60%) процесса рилизинга Nox из ЭМ. Процесс высвобождения Nox из МКС менее выражен (до 14%). Примечательно, что в отличие от воздействия X-облучения и УФО, воздействие УЗ не сопровождается агрегацией Nox в ЭМ и МКС. Возможно, это связано с тем, что УЗ в большей степени разрывает связи, ответственные за удержание Nox в мембранах, вызывая усиление процесса солюбилизации указанных гемопroteинов в гомогенную фазу. Под влиянием He-Ne-лазерного облучения NADPH-зависимая O₂⁻-продуцирующая активность Nox из ЭМ *in vitro* (гомогенная фаза) и в ЭМ *ex vivo* (гетерогенная фаза) повышается. После лазерного облучения ЭМ и МКС *ex vivo* и *in vitro* NADPH-зависимая O₂⁻-продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активность Nox из ЭМ и МКС, а также в ЭМ и МКС заметно повышаются, отсутствует процесс рилизинга и агрегации изоформ Nox. Положительное воздействие He-Ne-лазерного облучения на состояние и активность Nox в ЭМ и МКС *ex vivo*, возможно, связано с тем, что He-Ne-лазерное облучение оказывает антиоксидантный эффект путем заметного повышения стимулирования активности локализованной в мембранах каталазы. Фактически, подавление активности изоформ Nox при X-, УФ- облучении и действии ультразвука связано со стимуляцией процесса необратимой агрегации изоформ Nox. Наоборот, He-Ne-лазерное облучение вызывает стимуляцию иммунной системы и кислородного гомеостаза, повышая активность изоформ Nox.

6. Необратимое снижение преднизолоном уровня и активности NADPH-оксидаз в гомогенной и гетерогенной фазах

В результате аэробной инкубации (при 36°C в течение 60 мин) преднизолона (ПН) (по 10 мг) с растворами электрофоретически гомогенных изоформ Nox из ЭМ, МККМ, МКС, ЯКС и сыворотки крови *in vitro* происходит необратимое снижение плотности характерного максимального оптического поглощения (при 530 нм) этих Nox с соответственным снижением активности этих ферментов. Более толерантным является eNox (табл. 13, рис. 6-7). Этим путем ПН оказывает иммуносупрессорный эффект.

Таблица 13

NADPH-зависимая O_2^- -продуцирующая и ферриНв-восстанавливающая активность Nox из контрольных (К) и опытных (ОП) проб после воздействия 10 мг ПН, n=6, p< 0,03

Источники Nox:	O_2^- -продуцирующая активность Nox		ФерриНв-восстанавливающая активность Nox	
	К	ОП	К	ОП
Сыворотка крови	25,4 ± 4,8 (p<0,01)	24,8 ± 5,2 p<0,01	14,8 ± 2,7	14,5 ± 3,0
ЭМ	12,9 ± 1,8	5,6 ± 0,7	10,7 ± 1,6	4,8 ± 0,3
МККМ	22,3 ± 3,1	7,8 ± 0,5	12,3 ± 1,1	4,3 ± 0,1
МКС	14,6 ± 3,2	4,4 ± 0,2	8,5 ± 0,6	2,6 ± 0,2
ЯКС	12,2 ± 1,4 (p<0,02)	2,7 ± 0,1(p<0,01)	10,1 ± 0,5	2,3 ± 0,07

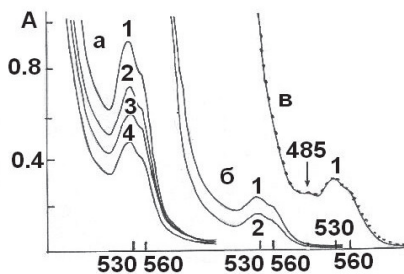


Рис. 6

Оптические поглощения электрофоретически гомогенных изоформ Nox без инкубации (а-1) и после инкубации Nox с 10 мг ПН) из: ЯКС (а-2), МКС (а-3), ЭМ (а-4). То же самое у Nox из МККМ без инкубирования (б-1) и после инкубирования с 10 мг ПН (б-2). Спектры поглощения eNox без инкубирования (-----) и после инкубации с 10 мг ПН (в-1) в течение часа при 36°C

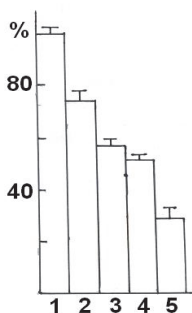


Рис.7

Относительное изменение NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриНв-восстанавливающей активности Nox в гетерогенной фазе непосредственно в ЭМ, МККМ, МКС, ЯКС (эта активность изменяется аналогичным образом) после их инкубирования с 10 мг ПН в течение часа при 36° по сравнению с 100% контрольными показателями (1): для ЯКС (2), МКС (3), МККМ (4) и ЭМ (5). Аналогичным образом изменяется и уровень (плотность оптического поглощения при 530 нм) Nox после их выделения из этих мембран

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Особенности инактивации и активации изоформ NADPH-оксидаз (Nox) клеточных формирований млекопитающих под влиянием различных широкоиспользуемых факторов (электростимуляция, цитокины, преднизолон, облучение различного характера, ультразвук, углекислый газ с галармином) существенно отличаются. Наблюдается повышение иммунореактивности гипоталамуса после его электрической стимуляции с увеличением уровня, NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности изоформ Nox в клеточных компонентах, в первую очередь, в клетках органа иммунной системы – селезенки, костного мозга, а также эритроцитов и сыворотки. Электрическая стимуляция крыс СКЭНАР методом, в большинстве случаев, приводит к повышению NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности, и к снижению ферриHb-восстанавливающей активности изоформ Nox с увеличением каталазной и СОД активности. Провоспалительные и противовоспалительные цитокины различного характера (ИФ-альфа, ФНО-альфа, ИЛ-4) действуют своеобразным образом: необратимо прилипают к молекулами Nox и экстрацеллюлярной Nox (eNox), вызывают увеличение или снижение NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности этих ферментов *in vitro*. Толерантность Nox против преднизолона несравненно выше у eNox, затем у Nox из компонентов клеток селезенки, костного мозга и эритроцитарных мембран (ЭМ).

Наблюдается подавление (при X-, УФ-облучении и УЗ) или стимулирование (при He-Ne-лазерном облучении) активности иммунной системы и кислородного гомеостаза с соответственным снижением или увеличением NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности изоформ Nox из ЭМ и клеток селезенки в гомогенной и гетерогенной фазах. При этом подавление этой активности в большинстве происходит на фоне повышения степени агрегации Nox в гомогенной и гетерогенной фазах, а стимуляция активности связана с повышением каталазной активности приведенных клеток. При интоксикации крыс двуокисью углерода, ассоциированного с кислородным голоданием наблюдается увеличение NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности изоформ Nox в эритроцитарных мембранах, мембранах клеток костного мозга, мембранах и ядрах клеток селезенки и сыворотке крови (eNox). Введенный в профилактическом режиме галармин оказывает протективное действие путем дополнительного повышения уровня Nox и приближения активности ключевых металлопротеинов антиоксидантной активности к норме, что приводит к значительному снижению числа погибших животных. Полученные результаты являются основанием для применения галармина в профилактическом режиме, особенно, в критических ситуациях, когда имеется угроза кислородного голодания.

ВЫВОДЫ

1. Повышение NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активности изоформ Nox обусловлено электрической стимуляцией SON и PVN гипоталамуса.
2. СКЭНАР-стимуляция приводит к повышению NADPH-зависимой O_2^- -продуцирующей активности и снижению ферриHb-восстанавливающей

активности изоформ Nox эритроцитарных мембран, клеток селезенки и костного мозга, а также к увеличению активности антиоксидантных ферментов.

3. При воздействии провоспалительных и противовоспалительных цитокинов наблюдается увеличение или уменьшение уровня и активности Nox *in vitro*.
4. Выявлено, что противовоспалительный эффект преднизолона обусловлен необратимым снижением активности Nox, за счет стимуляции процесса агрегации данного фермента.
5. Обнаружено, что He-Ne-лазерное облучение вызывает повышение активности изоформ Nox, а подавление его активности при X- , ультрафиолетовом облучении и воздействии ультразвука непосредственно связано со стимуляцией процесса необратимой агрегации изоформ данного фермента.
6. Воздействие CO₂ приводит к повышению уровня Nox в эритроцитарных мембранах, клетках селезенки и костного мозга, а также в сыворотке крови (eNox). Положительный эффект галармина при кислородном голодании связан с дополнительным увеличением уровня рассматриваемых показателей, а также активности антиоксидантных ферментов, способствующих эффективному использованию низких доз кислорода в экстремальных условиях.

СПИСОК РАБОТ , ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Л.Г. Мелконян, Р.М. Симонян, Э.С. Секоян, М.А. Симонян . Изменения NADPH зависимой супероксидпродуцирующей и ферригемоглобिनвосстанавливающей активности цитохрома b₅₅₈ из мембран клеток селезенки и эритроцитов, индуцированные излучением различной природы. // Докл. НАН РА, Биохимия, 2009, т. 109, № 3, с. 225-235.
2. Л.Г. Мелконян, Р.М. Симонян, Г.М. Симонян, М.А. Бабаян, Л.Н. Аракелян, Р.Л. Айрапетян, М.А. Симонян, А.А. Галоян. Повышение уровня NADPH-зависимой O₂⁻-продуцирующей и ферригемоглобин-восстанавливающей активностей изоформ цитохрома b₅₅₈ из мембран митохондрий и ядер клеток органов крыс после электрической стимуляции супраоптических и паравентрикулярных ядер гипоталамуса. // Нейрохимия, 2010, т. 27, № 2, с. 1-4.
3. Л.Г. Мелконян, Р.М. Симонян, В.А. Чавушян, Г.М. Симонян, Р.Р. Арутюнян, М.А.Бабаян, М.А.Симонян. Уровень и активность анти- и прооксидантных металлопротеинов после СКЭНАР-стимуляции у крыс. // Медицинская наука Армении, 2010, т. L, № 4, с. 40-49.
4. Л.Г. Мелконян, Р.М. Симонян, М.А. Бабаян, А.Р. Хачатрян, Р.Л. Айрапетян, Г.М. Симонян, Т.К. Давтян, М.А. Симонян. Изменение проинфламаторными цитокинами оптического спектральных свойств супероксид-продуцирующей и ферригемоглобин-восстанавливающей активностей изоформ NADPH оксидазы крыс *in vitro*. // Вопросы теоретической и клинической медицины, 2011, т. 14 , № 3(63), с. 21-25
5. Л.Г. Мелконян. Необратимое снижение преднизолоном уровня и активности NADPH оксидаз в гомогенной и гетерогенной фазах. // Вопросы теоретической и клинической медицины. 2012, №1(68), с. 30-33.
6. Р.М. Симонян, Л.Г. Мелконян, М.А. Бабаян, Г.М. Симонян, Л.Н. Аракелян, М.А. Симонян, А.А. Галоян. Защитная роль гипоталамического обогащенного пролином пептида при острой интоксикации крыс двуокисью углерода в условиях кислородного голодания. // Нейрохимия, 2012, т. 30, № 1, с. 64-70

ԼՈՒՍԻՆԵ ՀԱՄԼԵՏԻ ՄԵԼՔՈՆՑԱՆ

ԻՍՈՒՆԱԽԹԱՆԻՉՆԵՐԻ ԵՎ ԻՍՈՒՆԱԱՐԳԵԼԱԿԻՉՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄՈՂԵԿՈՒԼԱՑԻՆ ԿԵՆՍԱՔԻՄԻԱԿԱՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐՆ ԱՈՆԵՏՆԵՐԻ ՀՅՈՒՄՎԱԾՔՆԵՐԻ ՑԻՏՈՔՐՈՍ b₅₅₈-Ի ԻԶՈՉԵՎԵՐԻ ՎՐԱ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Մարդկանց և այլ կաթնասունների մոտ պաթոգենեզի մեխանիզմներից մեկն առնչվում է թթվածնի ակտիվ միացությունների՝ սուպերօքսիդ ռադիկալի (O₂⁻) և նրա ածանցյալների գոյացման և սպառման համակարգերի միջև եղած ֆիզիոլոգիական հաշվեկշռի խախտման հետ: Հիվանդությունների ընթացքում մեծամասամբ ավելանում է այդ ակտիվ թթվածնի միացությունների մակարդակը և դրանցով հարուցված կենսահամակարգերի օքսիդատիվ վնասման ինտենսիվությունը:

Բջջաբաղադրամասերում և արտաբջջային միջավայրում որպես O₂⁻-երի ֆերմենտային գոյացման համակարգեր առանձնակի կարևորվում է NADPH օքսիդազների (Nox) դերը:

Դրանք կարգավորում են իմունային համակարգում, գեների էքսպրեսիայի, միտոքոնդրիալ շնչառական ակտի և թթվածնային հոմեոստազի կարգավորման ժամանակ ընթացող օքսիդա-վերականգնման նյութափոխանակային գործընթացները:

Nox-երի հետ կատարված հետազոտությունները չափազանց կարևորվում են ու արդիական են: Դրանք առնչվում են Nox-երի ֆիզիկաքիմիական հատկությունների, բնութագրական ֆունկցիոնալ-կառուցվածքային փոփոխությունների, տարբեր տիպի պաթոլոգիաների ժամանակ NADPH-կախյալ սուպերօքսիդի գոյացման և ֆերիհեմոգլոբինվերականգնման ակտիվության, պակտրալ հատկանիշների և դրանց ակտիվազրկման գործոնների որոշման հետ: Ընդ որում Nox-ի տարբեր իզոմերը տեղակայված են նաև էրիթրոցիտների թաղանթներում, արյան շիճուկում և ասցիտային կարցինոմայի հեղուկներում (վերջիններս համարվում են արտաբջջային Nox-եր կամ eNox-եր):

Հայտնի են Nox-երի հետևյալ իզոմերները՝ gp91phox, p22phox, p40phox, p47phox և p67phox, Rac1, Rac2, որոնք գործում են ինքնուրույն կամ համակցված մեխանիզմով, ապահովելով ակտիվ նյութափոխանակային գործընթացների ընթացման համար O₂⁻-երի անհրաժեշտ մակարդակ: Nox-երը օժտված են ՆԱԴՓԻ-կախյալ O₂⁻-գոյացման և ֆերիհեմոգլոբինվերականգնման ակտիվությամբ:

Կախված հիվանդության բնույթից դիտվում է Nox-երի ակտիվության ընկճում կամ խթանում:

Այնուհանդերձ, բժշկության մեջ լայն կիրառում գտած որոշ արտաքին գործոնների (ռենտգենյան, ուլտրամանուշակագույն, He-Ne-լազերային ճառագայթումներ, ուլտրաձայն, տարբեր բնույթի էլեկտրախթանումներ, ինչպես նաև ցիտոկիններ, ածխաթթու գազ գալարմինի հետ միասին) ազդեցության ներքո Nox-երի իզոմերների, ինչպես նաև որոշ հակաօքսիդանտային մետաղապրոտեինների ակտիվությունների կրած համալիր բնութագրական փոփոխությունների մոլեկուլային-կենսաքիմիական մեխանիզմները դեռևս բացահայտված չեն:

Դրանց որոշումով ավելի կիստակեցվի կենսահամակարգերի վրա, այդ ազդակների՝ դոզայից կախված դրական և բացասական փոփոխությունների մեխանիզմները,

հնարավորին չափով զերծ մնալու օրգանիզմի վրա դրանց թողած վնասակար ազդեցություններից: Այս գործոնների որոշումն է հանդիսանում ստենախոսության նպատակը:

Կիրառվել են առավել ձեռնամխելի և լայն տարածում գտած մեթոդներ տարբեր տիպի իոնափոխանակիչների և հել-ֆիլտրող սեֆադեքսների օգտագործմամբ, ինչպես նաև օպտիկական և այլ սպիտակուցային անալիզի մեթոդներ:

Պրոօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների (ՊԱՄ)՝ Nox-ի իզոմերներ, սուպերօքսիդ գոյացնող լիպոպրոտեին՝ սուպրոլ, և հակաօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների (ՀԱՄ)՝ ՍՕՂ-ի իզոմերներ, կատալազ և այլ մակարդակների ու ակտիվությունների կրած բնութագրական փոփոխությունները դիտվում են որպես արյան, փայծաղի, ոսկրածուծի օքսիդատիվ վնասման մեխանիզմներ վերահիշյալ արտաքին գործոնների ազդեցության ներքո *in vitro*, *in vivo* և *ex vivo* .

Առնետների հիպոթալամուսի SON և PVN միջուկների համապատասխան պայմաններում էլեկտրախթանման հետևանքով նկատվում է առնետների փայծաղի, յարդի, երիկամների, սրտի և ուղեղի բջջաթաղանթների, կորիզների և միտոքոնդրիումների Nox-ի իզոմերների NADPH-կախյալ O_2^- -գոյացման և ֆերիհեմոգլոբինվերականգնման ակտիվության աճ: Nox-ի իզոմերների դիմադրողականությունը ընդդեմ լայնորեն օգտագործվող գլիկոլորտիկոդի՝ պրեդնիզոլոնի մեծ է eNox-ի մոտ, ապա փայծաղի, ոսկրածուծի և երիթրոցիտների թաղանթներից անջատված Nox-ի իզոմերների մոտ: Ռենտգենյան, ուլտրամանուշակագույն ճառագայթման և ուլտրաձայնի՝ Nox-ի իզոմերների վրա ունեցած վնասակար ազդեցության մեխանիզմներն առնչվում են այդ ֆերմենտի NADPH -կախյալ O_2^- գոյացնող և ֆերիհեմոգլոբինվերականգնող ակտիվության ընկճման հետ հոմոգեն և հետերոգեն ֆազերում: Այս պայմաններում Nox-ի իզոմերների ակտիվազրկումը առնչվում է դրանց անդառնալի ազրեգացման հետ՝ նույնպես հոմոգեն և հետերոգեն ֆազերում:

Nox-ի իզոմերների ակտիվության խթանումը He-Ne-լազերային ճառագայթման հետևանքով *in vitro* առնչվում է կատալազի ակտիվության էական աճով, կանխելով ջրածնի պերօքսիդի մակարդակի աճը: Վերջինս կարող է հանդիսանալ կենսահամակարգերի համար ծայրահեղ վտանգավոր հիդրօքսիլ ռադիկալների մակարդակի աճման գործոն: Ածխաթթու գազով հարուցված թթվածնային քաղցի պայմաններում առնետների հյուսվածքներում էապես աճում է Nox-ի իզոմերների մակարդակը՝ որպես օրգանիզմի հարմարվողական համակարգի պատասխան քայլ՝ թթվածնի խնայողաբար օգտագործման համար, ծայրահեղ անհրաժեշտ քանակի սուպերօքսիդներ գոյացնելու համար: Մյուս կողմից, պրոֆիլակտիկ ռեժիմով ներարկված գալարմինը շարունակում է պահպանել (ավելացնել) Nox-երի մակարդակը, ինչպես նաև հակաօքսիդանտային մետաղապրոտեինների ակտիվությունները, էապես նվազեցնելով մահացած կենդանիների քանակը: Ստացված տվյալները կարող են հանդիսանալ որպես գիտական հիմնավորումներ պրոֆիլակտիկ ռեժիմով գալարմինի օգտագործման համար հնարավոր ածխաթթու գազով թունավորման և հիպօքսիայի պայմաններում, որոնք կարող են առաջանալ տարբեր տեխնածին պայմաններում և անբարենպաստ էկոլոգիական պայմաններում (ստորջրյա աշխատանքների, տիեզերական հետազոտություններ կատարելու ժամանակ):

**MOLECULAR BIOCHEMICAL MECHANISMS OF INFLUENCE
OF THE IMMUNE ENHANCERS AND INHIBITORS UPON THE
CYTOCHROME b_{558} ISOFORMS OF RATS' TISSUES**

SUMMARY

One of mechanisms of pathogenesis in humans and other mammals is associated with the changes of the physiological balance between producing and utilizing systems of reactive oxygen species: superoxide radical (O_2^-) and its derivatives.

During diseases, in most cases, the level of reactive oxygen species and induction of the intensity of oxidative damage of biosystems were increased.

In the cell's membranes and extracellular medium, the role of NADPH oxidases (Nox), as a enzymatic O_2^- producing systems is particularly important.

The oxidation-reduction processes, which were carried out in the immune system are regulated, at the expression of the genes, in the mitochondrial burst and oxygen homeostasis. The investigations were associated with the determination of the physico-chemical properties of the isoforms of Nox in the norm and at various pathological states, the characteristic functional-structural changes, NADPH depending on superoxide-producing and ferrihemoglobin-reducing activities, optical spectral properties and the factors of the inactivation of these enzymes were important and actually. The localisation of the isoforms of Nox on the cell's membranes surface (22 phox and gp91 phox) and in cytosole (40 phox, 47phox, 67 phox and Rac1, Rac2) of the mammal's cell's were determined. On the other hand, the localisation of the isoforms of Nox in the extracellular nanoparticles – exosomes (extracellular Nox), in the blood serum and fluids of ascitic carcinomas and in the erythrocytes membranes were observed. It is known, that the isoforms of the Nox: gp91phox, p22phox, p40phox, p47phox and p67phox, Rac1, Rac2 were acted by the individual and combined mechanisms during production of the necessary level of O_2^- .

Depending on the types of the diseases, the decrease or increase of activities of the Nox was observed. On the other hand, the characteristic changes of the molecular-biochemical mechanisms of the activities of isoforms of Nox, as well as some antioxidative metalloproteins in the medicine, under the influence of several large application external factors (X-, ultraviolet, ultrasonic, He,Ne-laser irradiation, various type of electrostimulations, as well as cytokins, carbon dioxide with galarmin) were not determined yet. By determination of the character of these influences, depending on its dosage, the mechanisms of positive or negative effects of these factors will be corrected to decrease its negative effects on the organism.

The characteristic changes of the levels and activities of the prooxidative activity metalloproteins (PAM): the isoforms of Nox and superoxide-producing lipoprotein - suprol and antioxidative activity metalloproteins (MAA): isoforms of SOD, catalase et al., considered as a mechanisms of oxidative damage of the bone-marrow, blood and spleen oxidative damage after influence of these external factors *in vivo*, *in vitro* and *ex vivo*.

After electrostimulation of the hypothalamic nucleus SON and PVN in corresponding conditions, the increase of the NADPH depending O_2^- -producing and ferrihemoglobin-reducing activities of the isoforms of Nox from rat's spleen, kidney, heart and brain cell's membranes, nucleus and mitochondria were observed.

The counteraction of the isoforms of Nox against widely used glucocorticoids – prednisolone is higher at the eNox, than at the Nox isolated from spleen, bone-marrow cell's membranes. The damaging mechanisms of the X-, ultraviolet irradiation and ultrasonic influence on the isoforms of Nox were associated with the decrease of the NADPH depending O_2^- -producing and ferrihemoglobin-reducing activities of this enzyme in homogenous and heterogenous phases. In these conditions, the irreversible aggregation of the isoforms of Nox in homogenous and heterogenous phases were observed.

The stimulation of the activity of isoforms of Nox by the He,Ne-laser irradiation *in vitro* is associated with the increase of catalase activity and corresponding decrease of the level of hydrogen peroxide.

In these conditions the carbon dioxide induced oxygen insufficiency, as a answer step of the adaptation system of organism the elevation of the levels of isoforms of the Nox for the economical use of the oxygen for the generation of the exclusively amount of O_2^- was observed.

On the other hand, the injected of the galarmin in prophylactic regimen continued the elevation of the level of Nox, as well as, the activities of the antioxidative metalloproteins and essentially decreased the amount of death animals.

These indices can be used for scientific purposes, especially for the use of galarmin in prophylactic regimen at the conditions of the possible intoxication by carbon dioxide and oxygen insufficiency in various technogen catastrophes (submarine, cosmic works et al).



