

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ 8-ОКСО-2'-ДЕЗОКСИГУАНОЗИНА В ДНК КЛЕТОК ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

Н.В. Мармий[@], аспирант, Д.С. Есипов, доцент

Кафедра биоорганической химии, Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

[@] Автор для переписки, e-mail: marmiynv@gmail.com

Изучены изменения соотношения 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-охо-dG)/dG в ДНК гепатоцитов лабораторных мышей под действием токсического стресса. Показано, что введение четыреххлористого углерода вызывает рост содержания 8-охо-dG. При кратковременном токсическом стрессе происходит быстрое нарастание уровня 8-охо-dG в ДНК в течение первых суток эксперимента. Далее, через 48 часов после первичной инъекции, содержание 8-охо-dG падает до уровня контрольных значений. Такое поведение биомаркера можно объяснить активацией репарационной и антиоксидантных систем ткани. При последующей инъекции снова происходит повышение уровня 8-охо-dG, и в дальнейшем он только возрастает. Это свидетельствует об исчерпании репарационного потенциала организма и сопутствует развитию воспаления и патологического изменения ткани печени.

Ключевые слова: 8-оксо-2'-дезоксигуанозин, индуцированный цирроз печени, биомаркер окислительного стресса, обращенно-фазовая ВЭЖХ, электрохимическая детекция.

CHANGES OF 8-OXO-2'-DEOXYGUANOSINE LEVEL IN MOUSE LIVER CELLS DNA IN CASE OF ACUTE TOXIC STRESS

N.V. Marmiy[@], D.S. Esipov

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

[@]Corresponding author e-mail: marmiynv@gmail.com

The changes of the 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-охо-dG)/dG ratio in the DNA of laboratory mice hepatocytes under the influence of toxic stress were studied. It was shown that the injection of carbon tetrachloride causes the growth of 8-охо-dG level. A rapid increase in the level of 8-охо-dG in DNA occurs during the first day of the experiment at short-term toxic stress. Subsequently, 48 hours after the initial injection, the level of 8-охо-dG decreases to the control values. This change in the value of the biomarker can be attributed to the activation of the reparative and antioxidant systems. The subsequent injection results again in an increase of 8-охо-dG level, and the latter only increases thereafter. This reflects the exhaustion of the reparative potential of the organism and accompanies the progress of inflammation and pathological change of the liver tissue.

Keywords: 8-oxo-2'-deoxyguanosine, induced cirrhosis, biomarker of oxidative stress, reversed-phase HPLC, electrochemical detection.

Введение

8-Оксо-2'-дезоксигуанозин (8-охо-dG) – известный биомаркер окислительного стресса и сопряженных с ним заболеваний [1]. Как правило, его содержание в клеточной ДНК увеличивается при патологии и после стрессовых воздействий и возвращается к нормальным величинам при назначении адекватной

терапии или устранении стрессового фактора. Последнее связано с наличием в клетках всех живых организмов репаративного механизма удаления 8-охо-dG из цепи ДНК с последующим замещением его нормальным 2'-дезоксигуанозином. Благодаря таким достаточно быстрым изменениям содержания этого соединения в ДНК в ответ на внешние и внутренние факторы, его можно использовать в качестве «ран-

него» биомаркера эффективности медикаментозной и иной терапии. В частности, существуют исследования, выявившие корреляции между изменением уровня 8-охо-dG в крови и моче онкобольных при прохождении химиотерапии и их выживаемостью впоследствии [2]. Кроме того, по литературным данным, 8-охо-dG уже давно используется в качестве биомаркера аутоиммунных [3], воспалительных [4], аллергических [5] и нейродегенеративных заболеваний [6], а также старения [7] и ответа на стрессовые воздействия [8].

Также в последние годы в литературе появились данные о том, что 8-охо-dG может выступать в роли регуляторной молекулы, влияющей на активность ряда антиоксидантных и репаративных комплексов, а также на развитие воспалительных реакций [9–13]. В частности, экзогенный 8-охо-dG может ингибировать RAC/STAT-каскад и связанные с ним функции, такие как синтез воспалительных цитокинов и простагландинов, фагоцитоз и продукцию активных форм кислорода иммунокомпетентными клетками [9, 10]. За счет этого 8-охо-dG может оказывать противовоспалительное [11, 12] и противоаллергическое [13, 14] действие. Согласно экспериментальным данным корейской исследовательской группы, 8-охо-dG при применении в высоких дозах уменьшал у экспериментальных животных выраженность симптомов бронхиальной астмы [13], аутоиммунного энцефаломиелита [12], язвы желудка [11] и аллергии на овальбумин [14]. Также под действием этого соединения значительно сокращалась смертность мышей при сепсисе, индуцированном введением бактериальных липополисахаридов [10]. Также есть данные, что 8-охо-dG способен активировать экспрессию генов антиоксидантных и репаративных ферментов, в частности, ДНК-полимеразы β , и улучшать состояние клеточных культур при гипоксии, голодании и облучении [15].

В наших экспериментах по изучению влияния продолжительного токсического стресса, вызванного введением четыреххлористого углерода, на развитие цирроза печени было замечено аномальное снижение уровня 8-охо-dG на ранних стадиях эксперимента [16]. Поэтому целью настоящего исследования было отслеживание динамики изменения соотношения 8-охо-dG/dG при остром токсическом стрессе. В работе использовали мышей-самцов линии C57Bl/СВА в возрасте двух месяцев и модель острого токсического цирроза печени, вызванного введением четыреххлористого углерода.

Цирроз печени – тяжелое заболевание, нередко приводящее к смертельному исходу. Гистологически – это необратимый диффузный процесс, характерными чертами которого являются узелковая трансформация паренхимы и образование фиброзных септ,

соединяющих портальную систему с системой печеночных вен. В зависимости от этиологии, лечение его на настоящий момент производится аналогами желчных кислот (урсодиол), противовоспалительными (глюкокортикоиды) и иммуносупрессивными средствами. Последние имеют серьезные побочные эффекты. Есть основания полагать, что развитие цирроза сопровождается выраженным окислительным стрессом из-за инфильтрации и воспалительной активации иммунокомпетентных клеток, высвобождения свободных радикалов из микросом, а также ишемии и гипоксии на поздних стадиях [17]. Соответственно, содержание 8-охо-dG в ДНК должно возрастать пропорционально степени тяжести поражения печеночной ткани. В этом случае 8-охо-dG мог бы быть полезным биомаркером как для диагностики и оценки степени тяжести заболевания, так и для последующего определения эффективности терапии.

Выбор метода определения 8-охо-dG в составе клеточной ДНК также имеет существенное значение. Разработанный и прошедший валидацию в нашей лаборатории метод определения 8-охо-dG с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с амперометрической детекцией [18] является точным, селективным и чувствительным. Он более трудоемок, чем достаточно широко распространенный метод иммуноферментного анализа, однако при диагностическом использовании биомаркера точность метода важнее скорости анализа, особенно если требуется наблюдать динамику ответа на лечение.

Результаты и их обсуждение

В нашем эксперименте мыши были разделены на две опытных и одну контрольную группы. Токсический стресс у мышей первой опытной группы вызывали путем внутрибрюшинного введения четыреххлористого углерода в дозе 1 мкл/г в виде 30% раствора в персиковом масле. Чтобы учесть возможные изменения окислительного статуса из-за стресса при инъекции, а также исключить возможные биологические эффекты персикового масла, была создана вторая опытная группа, получавшая внутрибрюшинно чистое персиковое масло в том же количестве и с той же частотой, что и первая.

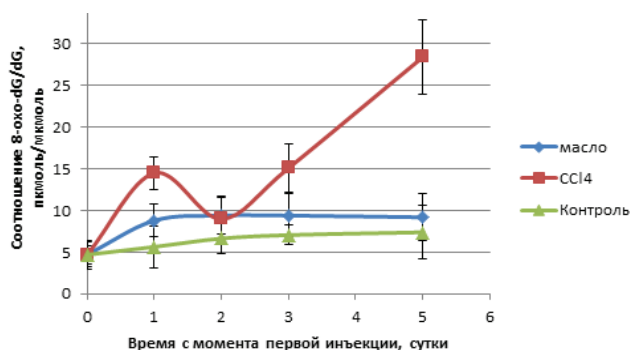
Во все дни эксперимента у животных, получавших инъекции масла, были обнаружены несколько более высокие уровни 8-охо-dG, нежели у интактных, однако не всегда эти различия были достоверны. При этом, по всей видимости, стресс от инъекции является кратковременным, так как на третий день эксперимента, когда с момента вмешательства прошло 72 часа, соотношение 8-охо-dG/dG в ДНК мышей, получивших инъекцию масла, приблизилось к таковому для контрольных животных. В то же время, на первый день, когда с момента последней

инъекции прошли всего сутки, у этих мышей наблюдалось достоверное повышение содержания 8-оксо-dG в сравнении с контролем.

В отличие от простого повреждения тканей при инъекции персикового масла, введение четыреххлористого углерода оказывает долговременный и накопительный эффект на соотношение 8-оксо-dG/dG в составе ДНК. Теоретически, в это время должен наблюдаться выраженный окислительный стресс – согласно литературным данным, гепатотоксичность четыреххлористого углерода обусловлена тем, что в процессе его метаболизма образуется активный трихлорметильный радикал ($\text{CCl}_3\cdot$), который повреждает клеточные мембраны и стимулирует в них перекисное окисление липидов [19]. В результате этого генерируются свободные радикалы, взаимодействующие далее с белками и, в конечном итоге, с нуклеотидами и ДНК.

На следующий день после инъекции содержание 8-оксо-2'-дезоксигуанозина у мышей 1-ой опытной группы было достоверно выше, чем у контрольных животных и животных, получивших инъекцию персикового масла (см. рисунок).

На второй день эксперимента (через 48 ч) у мышей, получавших инъекции четыреххлористого углерода, наблюдалось достоверное снижение содержания 8-оксо-dG в ДНК клеток печени в сравнении с уровнем 8-оксо-dG, получены через 24 ч после инъекции (см. рисунок). Соотношение 8-оксо-dG/dG в этот день приблизилось к значению уровня 8-оксо-dG для 2-ой группы, получавшей инъекцию масла. Эти результаты воспроизводились в трех сериях эксперимента.



Динамика соотношения 8-оксо-dG/dG за первые 5 дней эксперимента для животных, получавших инъекции масла и четыреххлористого углерода, и контрольной группы.

Наблюдаемое снижение уровня 8-оксо-dG можно объяснить активизацией системы репарации ДНК в ходе адаптивной реакции организма на стресс. При этом, несмотря на то, что токсический агент все еще присутствует в организме, накопления 8-оксо-dG не происходит. Более того, уровень окислительных по-

вреждений ДНК, повысившийся спустя 24 ч после инъекции, по прошествии 48 ч возвращался к значениям, практически соответствующим контрольным.

Следует отметить, что детектируемое количество 8-оксо-dG всегда отражает «равновесие» двух процессов – окисления 2'-дезоксигуанозина, приводящего к образованию 8-оксо-dG, и репарации 8-оксо-dG в цепи ДНК с замещением на неокисленный dG. Оба процесса постоянно протекают на некоем базовом уровне, который соответствует обнаруживаемому у интактных здоровых животных содержанию 8-оксо-dG. Соответственно, в первые сутки после введения четыреххлористого углерода мы наблюдали четкий сдвиг равновесия в сторону образования 8-оксо-dG, его содержание возросло примерно в 3 раза в сравнении с контролем. Это закономерно и ожидаемо, если учесть известные из литературы механизмы как действия четыреххлористого углерода, так и развития поражения печени в условиях токсического стресса. Но спустя 48 ч после инъекции этот сдвиг компенсируется увеличением интенсивности обратного процесса – процесса репарации, приводящего к удалению 8-оксо-dG из ДНК. При этом интенсивность репарации 8-оксо-dG возрастает в сравнительно короткий срок даже не до уровня, компенсирующего его образование (в этом случае кривая показала бы плато или небольшой спад), а до более высокого значения, способного сдвинуть равновесие в обратную сторону. Вряд ли столь значительная и быстрая интенсификация репарации возможна без некоего сигнала, приводящего либо к увеличению экспрессии 8-оксигуанин-гликозилазы-1 (OGG-1), либо к возрастанию ее активности при неизменном количестве копий фермента, либо к подключению альтернативных механизмов репарации, обычно не применяемых для удаления 8-оксо-dG из ДНК неделящейся клетки. Возможно, такого рода сигналом для индукции адаптивного ответа клетки может служить и сам 8-оксо-dG, либо аналогичный продукт окислительных повреждений биомолекул. В пользу того, что 8-оксо-dG мог бы выступить регулятором адаптивной активизации репарации, свидетельствует ряд как теоретических соображений, так и экспериментальных данных. В частности, его предшественник – 2'-дезоксигуанозин присутствует в клетке в больших количествах, притом не только в составе труднодоступной для свободных радикалов ДНК, но и в цитоплазматическом пуле, и имеет сравнительно низкий окислительно-восстановительный потенциал. Сам 8-оксо-dG является маленькой и подвижной молекулой и в этом схож со многими сигнальными соединениями. Что немаловажно, 8-оксо-dG легко подвергается дальнейшему окислению и, по всей видимости, в условиях активной внутриклеточной среды живет недолго [20]. Это обеспечивает

быстрое прекращение сигнала, когда необходимость в нем отпадает. Наконец, версию подтверждают экспериментальные данные, сообщающие об активации некоторых ферментов репарации экзогенным 8-охо-dG либо смесью окисленных нуклеотидов, а также их общем протекторном и адаптогенном действии [21].

После повторной инъекции четыреххлористым углеродом, на третий день эксперимента соотношение 8-охо-dG/dG в ДНК животных первой опытной группы снова увеличивалось в сравнении с интактным контролем. По всей видимости, очередное поступление четыреххлористого углерода приводит к превышению компенсационного порога, и системы репарации и антиоксидантной защиты более не способны справиться со все возрастающим окислительным повреждением ДНК и клетки в целом.

К пятому дню эксперимента содержание 8-охо-dG в ДНК печеночных клеток мышей первой опытной группы превысило более, чем в 5 раз таковое как у интактных животных, так и у второй опытной группы. По-видимому, при такой продолжительности и интенсивности токсического стресса стала невозможной его компенсация с помощью любых имеющихся в клетке репарационных и антиоксидантных систем. В экспериментах наших коллег [22] как раз на пятый день при аналогичной схеме опыта выявлялись выраженные гистологические симптомы токсического цирроза печени. Это явственно свидетельствует о том, что адаптивный потенциал клетки к этому моменту оказывается исчерпанным, и далее следуют уже тканевые реакции, такие как воспаление, фиброидизация, инфильтрация макрофагов и иные в той или иной степени успешные попытки справиться с возрастающим повреждением ткани.

Как можно заметить, механический стресс от инъекции масла накопительного эффекта не дает – уровень биомаркера на пятый день вновь показывает достоверные различия с исходной точкой и группой интактного контроля, но в среднем не отличается от такового для второго и третьего экспериментального дня.

Таким образом, показано, что при кратковременном токсическом стрессе происходило быстрое нарастание уровня 8-охо-dG в ДНК, который падал до уровня контрольных значений через 48 часов после первичной инъекции четыреххлористого углерода. Такое поведение биомаркера можно объяснить активацией репарационной и антиоксидантных систем. При последующей инъекции снова происходило повышение уровня 8-охо-dG, который в дальнейшем только возрастал, что свидетельствовало об исчерпании репарационного потенциала организма и приводило к развитию воспаления и паталогическому изменению ткани печени.

Экспериментальная часть

Реактивы: ацетат натрия, ацетат аммония (Химмед), Трис-HCl, додецилсульфат натрия (SDS)

(Reanal), ЭДТА (Chemika), 2'-дезоксигуанозин (Sigma Grade). 8-Оксо-2'-дезоксигуанозин был синтезирован аналогично [23].

РНКаза А 10 мг/мкл (Qiagen), нуклеаза P1 100U, лиофилизованная из смеси 20 mM ацетата натрия, pH 5.3, 1 mM ZnCl₂, 50 mM NaCl (USBiological), протеиназа К, 100 мкг/мл (Fermentas), щелочная фосфатаза 1 ед./мкл, растворенная в 20 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂.

Ацетонитрил HPLC-R (Biosolve), этанол (SERVA), хлороформ «х.ч.», изоамиловый спирт «ч.» (Химмед).

Буферные растворы

Буфер I: 150 mM NaCl, 10 mM Трис-HCl, ЭДТА (pH 8.0).

Буфер для нуклеазы PI: 20 мкл 10 mM (AcO)₂Zn, 40 мкл 0.1 M AcONa.

Буфер для щелочной фосфатазы FastAP™: 10 × 100 mM Трис-HCl (pH 8.0 при 37°C), 50 mM MgCl₂, 1M KCl, 0.2% Тритон X-100 и 1 мг/мл бычий сывороточный альбумин (BSA).

Оборудование: Аналитическую ВЭЖХ образцов гидролизата ДНК проводили на хроматографе «Beckman» (США), оснащенном двумя насосами модели 114М «Beckman», УФ-детектором «KNAUER» с переменной длиной волны (детекцию осуществляли при длине волны 254 нм и толщине кюветы 2 мм), инжектором Altex 210A Valve «Beckman», контроллером Beckman 421A, электрохимическим детектором фирмы «НПО Химавтоматика». Использовали колонку ULTRASPHERE ODS (5 мкм, 4.6×250 мм) фирмы «Beckman». УФ-спектры регистрировали на спектрометре Helios α «Unicam» (Великобритания) в интервале длин волн 220–300 нм. Образцы осаждали на центрифуге Sigma 202 МК «Sigma» (США) и высушивали на аппарате Speed Vac Concentrator «Savant» (США).

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически при λ = 260 нм; dG при λ = 254 нм, 8-охо-dG при λ = 293 нм.

Хроматограммы регистрировали с помощью программы «Мультихром» («Ampersand Ltd.» версия 1,52u, Россия).

Модель острого токсического повреждения печени

В эксперименте использовали мышей-самцов линии C57Bl/СВА в возрасте 2-х месяцев. Животные содержались в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, с естественной сменой дня и ночи, t=20°C.

Мыши были разделены на три группы – две опытных и контрольную. У животных первой опытной группы вызывали токсический стресс путем внутрибрюшинного введения CCl₄ в дозе 1 мкл/г в виде 30% масляного раствора в персиковом масле в нача-

ле первых и третьих суток эксперимента. Животные второй опытной группы внутривенно получали чистое персиковое масло в том же количестве и с той же частотой, что и первая. Для изучения динамики развития оксидативного стресса животных выводили из эксперимента на разных сроках – 1-й, 2-й, 3-й и 5-й дни от его начала. Печень мышей использовали для выделения ДНК и измерения соотношения 8-оксо-dG/dG.

Выделение нуклеиновых кислот из печени мышей

Примерно 100 мг образца печени мыши помещали в пластиковые пробирки для центрифугирования, прибавляли 400 мкл буфера (150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl, ЭДТА (pH 8.0)) и гомогенизировали. Затем к 400 мкл полученного гомогената добавляли 20 мкл 20% SDS, 40 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубировали 2 ч при 55°C. После инкубации добавляли 3 М LiClO₄ (40 мкл) и 3 М ацетат натрия (40 мкл) и перемешивали встряхиванием.

К полученному раствору добавляли смесь хлороформ – изоамиловый спирт (24:1, 600 мкл), встряхивали и центрифугировали при 13400 об./мин в течение 10 мин, отбирали водную фазу. Данную процедуру повторяли 2 раза. Затем к водной смеси добавляли охлажденный до -18°C 96% этанол (1.5 мл). Образцы выдерживали ночь при -20°C и центрифугировали при 8000 об./мин в течение 10 мин. Затем декантировали спирт и добавляли охлажденный до -18°C 75% этанол до 2 мл. Образцы перемешивали на аппарате «Вортекс», а затем центрифугировали при 13400 об./мин в течение 10 мин. Спиртовой раствор удаляли. Полученный осадок нуклеиновых кислот подсушивали в течении 30 мин в вакууме. Хранили при -18°C.

Выделение ДНК

Осадок, полученный на предыдущей стадии, растворяли в 200 мкл буфера (150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl, ЭДТА (pH 8.0)), добавляли 1 мкл РНКазы А (10 мг/мл) и инкубировали в термостате при 37°C в течение 4 ч. После инкубации в каждую пробирку приливали охлажденный до -18°C 96% этанол (1.8 мл) и оставляли на ночь при -20°C. Центрифугиро-

вали при 8000 об./мин в течение 10 мин. Затем спирт сливали, добавляли охлажденный до -18°C 75% этанол (1 мл), перемешивали и центрифугировали при 13400 об./мин и -30°C в течение 5 мин. Спирт декантировали и образцы высушивали. Осадок растворяли в 400 мкл дистиллированной воды. Концентрацию ДНК определяли методом УФ-спектроскопии и отбирали в пробирки аликвоты, содержащие по 10 о.е., для последующего гидролиза. Образцы высушивали на аппарате Speed Vac Concentrator в течение 30 мин. Высушенные образцы хранили при -80°C.

Гидролиз ДНК

Образцы, полученные после экстракции, растворяли в 200 мкл дистиллированной воды. К полученным растворам добавляли буфер для нуклеазы РІ (20 мкл). Прогревали растворы 3 мин при 95°C, затем быстро охлаждали и добавляли 2.0 ед. акт. нуклеазы РІ и инкубировали при 55°C в течение 2 ч. После этих процедур добавляли буфер для щелочной фосфатазы (22 мкл) и по 1 мкл щелочной фосфатазы (1 ед. акт.). Инкубировали при 37°C в течение 1 ч, прогревали при 80°C 5 мин и центрифугировали 5 мин при 13400 об./мин.

Обращенно-фазовая ВЭЖХ в сочетании с амперометрической детекцией (для гидролизата ДНК)

Полученный гидролизат ДНК анализировали с помощью ОФ ВЭЖХ с использованием спектрофотометрической и амперометрической детекции. Колонка ULTRASPHERE ODS 4.6×250 мм (5 мкм). Подвижная фаза А: 0.1 М AcONH₄; подвижная фаза Б: CH₃CN; градиент 5–15% ацетонитрила за 20 мин; скорость потока 1 мл/мин. Детекцию осуществляли на УФ-детекторе при 254 нм и на амперометрическом детекторе при постоянном режиме при напряжении на электроде 0.4 В.

Благодарности

Благодарим за предоставление биологического материала для исследований сотрудника кафедры эмбриологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова Супруненко Е.А.

Список литературы:

1. Невредимова Т.С., Мармий Н.В., Есипов Д.С. Есипова О.В., Швеца В.И. // Вестник МИТХТ. 2014. Т. 9. № 5. С. 3–10.
2. Roszkowski K., Jozwicki W., Blaszczyk P., Mucha-Malecka A., Siomek A. // Med. Sci. Monit. 2011. V. 17. № 6. P. 329–333.
3. Lisitsyna T.A., Durnev A.D. // Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiya (Experimental and Clinic Pharmacology). 1999. V. 62. P. 38–41. (in Russ.).

References:

1. Nevredimova T.S., Marmiy N.V., Esipov D.S., Esipova O.V., Shvets V.I. Vestnik MITHT (Fine Chemical Technologies). 2014. V. 9. № 5. P. 3–10. (in Russ.).
2. Roszkowski K., Jozwicki W., Blaszczyk P., Mucha-Malecka A., Siomek A. Med. Sci. Monit. 2011. V. 17. № 6. P. 329–333.
3. Lisitsyna T.A., Durnev A.D. Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiya (Experimental and Clinic

4. Haghdoost S., Maruyama Y., Pecoits-Filho R., Heimbürger O., Seeberger A., Anderstam B., Suliman M.E., Czene S., Lindholm B., Stenvinkel P., Harms-Ringdahl M. // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006. V. 8. № 11-12. P. 2169–2173.
5. Svecova V., Rossner P.J., Dostal M., Topinka J., Solansky I., Sram R.J. // *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2009. V. 662. № 1. P. 37–43.
6. Dorszewska J., Florczak J., Rozycka A., Kempisty B., Jaroszevska-Kolecka J., Chojnacka K., Trzeciak W.H., Kozubski W. // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 2007. V. 67. № 2. P. 113–129.
7. Hamilton M.L., Van Remmen H., Drake J.A., Yang H., Guo Z.M., Kewitt K., Walter C.A., Richardson A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 18. P. 10469–10474.
8. Haghdoost S., Czene S., Näslund I., Skog S., Harms-Ringdahl M. // *Free Radical Research*. 2005. V. 39. Is. 2. P. 153–162.
9. Huh J.Y., Son D.J., Lee Y., Lee J., Kim B., Lee H.M., Jo H., Choi S., Ha H., Chung M.H. // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. V. 53. № 1. P. 109–121.
10. Kim D.H., Cho I.H., Kim H.S., Jung J.E., Kim J.E., Lee K.H., Park T., Yang Y.M., Seong S.Y., Ye S.K., Chung M.H. // *Experimental & Molecular Medicine*. 2006. V. 38. № 4. P. 417–427.
11. Ock C.Y., Kim E.H., Choi D.J., Lee H.J., Hahm K.B., Chung M.H. // *World J. Gastroenterol.* 2012. V. 18. № 4. P. 302–308.
12. Hong G.U., Kim N.G., Jeoung D., Ro J.Y. // *J. Neuroimmunol.* 2013. V. 260. № 1. P. 60–73.
13. Kim J.S., Kim D.Y., Lee J.K., Ro J.Y., Chung M.H. // *Eur. J. Pharmacol.* 2011. V. 651. № 1. P. 218–226.
14. Hong G.U., Kim N.G., Ro J.Y. // *Radiat. Res.* 2014. V. 181. № 4. P. 425–438.
15. Unnikrishnan A., Prychitko T.M., Patel H.V., Chowdhury M.E., Pilling A.B., Ventrella-Lucente L.F., Papakonstantinou E.V., Cabelof D.C., Heydari A.R. // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. V. 50. № 2. P. 270–280.
16. Невредимова Т.С., Ключ К.А., Мармий Н.В., Налобин Д.С., Чернышева М.Б., Василегина Ю.И., Супруненко Е.А., Беспятых А.Ю., Есипов Д.С. Изучение защитного действия мелатонина на модели индуцированного цирроза печени с помощью анализа содержания 8-оксо-2'-дезоксигуанозина // X Междунар. симпозиум «Биологические механизмы старения»: сб. тезисов. 16–19 мая 2012, Харьков, Украина. Харьков: Изд-во Харьковского госуд. ун-та, 2012. С. 45.
17. Lieber C.S. // *Advances in Pharmacology*. 1997. V. 38. P. 601–628.
18. Есипов Д.С., Сидоренко Е.В., Есипова О.В., Горбачева Т.А., Невредимова Т.С., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Реутов В.П. // *Вестник МИТХТ*. 2010. Т. 5. № 3. С. 69–74.
- Pharmacology). 1999. V. 62. P. 38–41. (in Russ.).
4. Haghdoost S., Maruyama Y., Pecoits-Filho R., Heimbürger O., Seeberger A., Anderstam B., Suliman M.E., Czene S., Lindholm B., Stenvinkel P., Harms-Ringdahl M. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006. V. 8. № 11-12. P. 2169–2173.
5. Svecova V., Rossner P.J., Dostal M., Topinka J., Solansky I., Sram R.J. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2009. V. 662. № 1. P. 37–43.
6. Dorszewska J., Florczak J., Rozycka A., Kempisty B., Jaroszevska-Kolecka J., Chojnacka K., Trzeciak W.H., Kozubski W. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 2007. V. 67. № 2. P. 113–129.
7. Hamilton M.L., Van Remmen H., Drake J.A., Yang H., Guo Z.M., Kewitt K., Walter C.A., Richardson A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 18. P. 10469–10474.
8. Haghdoost S., Czene S., Näslund I., Skog S., Harms-Ringdahl M. *Free Radical Research*. 2005. V. 39. Is. 2. P. 153–162.
9. Huh J.Y., Son D.J., Lee Y., Lee J., Kim B., Lee H.M., Jo H., Choi S., Ha H., Chung M.H. *Free Radic. Biol. Med.* 2012. V. 53. № 1. P. 109–121.
10. Kim D.H., Cho I.H., Kim H.S., Jung J.E., Kim J.E., Lee K.H., Park T., Yang Y.M., Seong S.Y., Ye S.K., Chung M.H. *Experimental & Molecular Medicine*. 2006. V. 38. № 4. P. 417–427.
11. Ock C.Y., Kim E.H., Choi D.J., Lee H.J., Hahm K.B., Chung M.H. *World J. Gastroenterol.* 2012. V. 18. № 4. P. 302–308.
12. Hong G.U., Kim N.G., Jeoung D., Ro J.Y. *J. Neuroimmunol.* 2013. V. 260. № 1. P. 60–73.
13. Kim J.S., Kim D.Y., Lee J.K., Ro J.Y., Chung M.H. *Eur. J. Pharmacol.* 2011. V. 651. № 1. P. 218–226.
14. Hong G.U., Kim N.G., Ro J.Y. *Radiat. Res.* 2014. V. 181. № 4. P. 425–438.
15. Unnikrishnan A., Prychitko T.M., Patel H.V., Chowdhury M.E., Pilling A.B., Ventrella-Lucente L.F., Papakonstantinou E.V., Cabelof D.C., Heydari A.R. *Free Radic. Biol. Med.* 2011. V. 50. № 2. P. 270–280.
16. Nevredimova T.S., Klyus K.A., Marmiy N.V., Nalobin D.S., Chernysheva M.B., Vasilegina Yu.I., Suprunenko E.A., Bespyatykh A.Yu., Esipov D.S. Study of the protective effect of melatonin on the model of induced liver cirrhosis by analyzing the content of 8-oxo-2'-deoxyguanosine / X Int. Symp. "Biological mechanisms of aging": a collection of abstracts. May 16–19, 2012, Kharkov, Ukraine. Kharkov: Kharkov State University Publ., 2012. P. 45. (in Russ.).
17. Lieber C.S. *Advances in Pharmacology*. 1997. V. 38. P. 601–628.
18. Esipov D.S., Sidorenko E.V., Esipova O.V., Gorbacheva T.A., Nevredimova T.S., Krushinskiy A.L., Kuzenkov V.S., Reutov V.P. *Vestnik MITHT (Fine*

19. Ingawale D.K., Mandlik S.K., Naik S.R. // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014. V. 37. № 1. P. 118–133.
20. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.
21. Glebova K., Veiko N., Kostyuk S., Izhevskaya V., Baranova A. // *Cancer Lett.* 2015. V. 356. № 1. P. 22–33.
22. Чернышева М.Б., Василегина Ю.И., Налобин Д.С., Ключ К.А., Невредимова Т.С., Мармий Н.В., Супруненко Е.А., Беспярых А.Ю., Есипов Д.С. Изучение защитного действия мелатонина на модели индуцированного фиброза печени: оценка гистологической картины // X Междунар. симпозиум «Биологические механизмы старения»: сб. тезисов. 16–19 мая 2012, Харьков, Украина. Харьков: Изд-во Харьковского госуд. ун-та, 2012. С. 64.
23. Satyam Nampalli, Shiva Kumar // *Bioorganic & Med. Chem. Lett.* V. 1
- Chemical Technologies*). 2010. V. 5. № 3. P. 69–74. (in Russ.).
19. Ingawale D.K., Mandlik S.K., Naik S.R. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014. V. 37. № 1. P. 118–133.
20. Menshikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., Bondar I.A., Krugovich N.F., Trufakin V.A. *Oxidative stress. Pro-oxidants and antioxidants*. Moscow: Slovo Publ., 2006. 556 p. (in Russ.).
21. Glebova K., Veiko N., Kostyuk S., Izhevskaya V., Baranova A. *Cancer Lett.* 2015. V. 356. № 1. P. 22–33.
22. Chernysheva M.B., Vasilegina Y.I., Nalobin D.S., Klyus K.A., Nevredimova T.S., Marmiy N.V., Suprunenko E.A., Bespyatykh A.Yu., Esipov D.S. Study of the protective effect of melatonin on the model of induced liver fibrosis: histologic evaluation / X Int. Symp. "Biological mechanisms of aging": a collection of abstracts. May 16–19, 2012, Kharkov, Ukraine. Kharkov: Kharkov State University Publ., 2012. P. 64. (in Russ.).
23. Satyam Nampalli, Shiva Kumar. *Bioorganic & Med. Chem. Lett.* V. 10. Is. 15. P. 1677–1679.