

ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ ИММУНОСУПРЕССИВНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМИНОКИСЛОТ И АНТИОКСИДАНТОВ НА МОДЕЛИ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА ФАГОЦИТОВ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

На модели Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах взаимодействие L-аргинина с транс-ресвератролом соответствует критериям антагонизма, с мелатонином – синергизма, с таурином – аддитивности в наиболее выгодных молярных сочетаниях. Результат взаимодействия таурина с ресвератролом и мелатонином зависит от молярного соотношения компонентов и их концентраций и колеблется от аддитивности до антагонизма. Трехкомпонентная комбинация транс-ресвератрола, мелатонина и аргинина демонстрирует синергизм, тем более выраженный, чем больше мелатонина входит в состав композиции. Замена мелатонина на таурин приводит к антагонизму компонентов.

Ключевые слова: транс-ресвератрол, мелатонин, аргинин, таурин, комбинации лекарственных средств, синергизм, активные формы кислорода, макрофаги.

N.A. Bizunok

PHARMACODYNAMIC IMMUNOSUPPRESSIVE INTERACTIONS OF THE AMINO ACIDS AND ANTIOXIDANT SUBSTANCES ON THE MODEL OF RESPIRATORY BURST OF MACROPHAGES

Amino acid L-arginine interacts with trans-resveratrol in antagonistic, with melatonin in synergistic and with taurine in additivity manner in some efficient ratios regard to the Nox2-dependent reactive oxygen species production on the model of respiratory burst of macrophages. Pharmacodynamic interactions of taurine with trans-resveratrol and melatonin dependent on their molar ratios and concentrations and exchangeable from synergistic to antagonistic pattern. The combination consist of trans-resveratrol, melatonin and L-arginine demonstrate the synergism more potent in high concentrations of melatonin. Substitution of the melatonin on taurine leads to the antagonistic interaction.

Key words: trans-resveratrol, L-arginine, melatonin, taurine, drug combinations, synergism, reactive oxygen species, macrophages.

В предыдущей работе обсуждались результаты изучения фармакодинамического взаимодействия известных иммуномодуляторов и антиоксидантов ресвератрола, мелатонина и аскорбата на модели респираторного взрыва макрофагов [1]. Настоящее исследование посвящено испытанию комбинаций 2-х аминокислот – аргинина и таурина. Эти аминокислоты известны своим иммуномодулирующим по-

тенциалом и входят в состав ряда комбинированных лекарственных средств, назначаемых при состояниях, ассоциированных с иммунным воспалением и оксидантным стрессом [2, 3, 5, 6, 20, 19]. Поиск эффективных стратегий фармакологического управления фагоцитарной генерацией активных форм кислорода (АФК) стал основанием для изучения их индивидуального действия аргинина и таурина на респира-

торный взрыв фагоцитов, в результате которого было установлено, что они дозозависимо подавляют этот процесс в биологически приемлемых концентрациях [2]. Следующим

шагом было изучение потенциала их фармакодинамических взаимодействий между собой, а также с ресвератролом и мелатонином – ингибиторами респираторного взрыва

фагоцитов, реализующими разные антирадикальные и биологические механизмы действия. Результаты этих испытаний представлены в настоящей работе.

Таблица 1. Индивидуальное и комбинированное действие транс-ресвератрола, мелатонина, L-аргинина и таурина на окислительный взрыв макрофагов (по критерию АУС ХЛ, n=5)

Состав комбинации	КОК ¹	IC ₅₀ ² (-Log, M)		EC _{max} ³ (-Log, M)	E _{max} ⁴ , % (M±m)
		Среднее значение	Доверительный интервал (95%)		
t-Ресвератрол	—	5,74	5,95—5,54	5,00	-70,0±4,5
Мелатонин	—	3,53	3,64—3,41	3,00	-50,2±5,1
L-Аргинин	—	2,25	2,69—1,84	2,00	-53,9±7,6
Таурин	—	2,16	2,53—1,79	2,00	-51,7±4,0
Композиция 1 t-Ресвератрол + L-Аргинин					
t-Ресвератрол	1	4,92	6,14—3,71	5,00	-47,4±3,3
L-Аргинин	100	2,92	4,14—1,71	3,00	
t-Ресвератрол	1	—	—	5,00	-38,4±11,4
L-Аргинин	1000	—	—	2,00	
Композиция 2 t-Ресвератрол + Мелатонин					
t-Ресвератрол	1	6,15	7,00—5,29	5,00	-83,4±5,2
Мелатонин	1	6,15	7,00—5,29	5,00	
t-Ресвератрол	1	6,85	7,50—6,21	5,00	-84,2±5,5
Мелатонин	10	5,85	6,50—5,21	4,00	
t-Ресвератрол	1	7,36	7,84—6,87	6,00	-81,2±1,9
Мелатонин	100	5,36	5,84—4,87	4,00	
Композиция 3 Мелатонин + L-Аргинин					
Мелатонин	1	3,31	3,49—3,13	3,00	-58,7±5,5
L-Аргинин	1	3,31	3,49—3,13	3,00	
Мелатонин	1	2,97	3,15—2,80	3,00	-51,4±2,4
L-Аргинин	10	1,97	2,15—1,80	2,00	
Мелатонин	1	—	—	4,00	-19,1±6,6
L-Аргинин	100	—	—	2,00	
Композиция 4 Таурин + L-Аргинин					
Таурин	1	—	—	2,00	-26,7 ±10,2
L-Аргинин	1	—	—	2,00	
Таурин	1	—	—	3,00	-29,6±7,6
L-Аргинин	10	—	—	2,00	
Композиция 4 Таурин + t-Ресвератрол					
Таурин	100	3,20	4,33—2,33	3,00	-57,8±5,6
t-Ресвератрол	1	5,20	6,33—4,33	5,00	
Таурин	1000	—	—	3,00	-23,8±6,0
t-Ресвератрол	1	—	—	6,00	
Композиция 5 t-Ресвератрол + L-Аргинин + Мелатонин					
t-Ресвератрол	1	5,09	5,23—4,95	5,00	-52,7±3,9
L-Аргинин	1000	2,09	2,23—1,95	2,00	
Мелатонин	100	3,09	3,23—2,95	3,00	
t-Ресвератрол	1	—	—	5,00	-35,7±2,3
L-Аргинин	1000	—	—	3,00	
Мелатонин	10	—	—	4,00	
Композиция 6 Таурин + L-Аргинин + t-Ресвератрол					
Таурин	100	3,22	4,03—2,41	3,00	-54,1±2,6
L-Аргинин	100	3,22	4,03—2,41	3,00	
t-Ресвератрол	1	5,22	6,03—4,41	5,00	
Таурин	100	—	—	3,00	-44,9±5,4
L-Аргинин	1000	—	—	2,00	
t-Ресвератрол	1	—	—	5,00	

Примечание к таблицам 1 и 2. ¹КОК – комбинаторное отношение компонентов, ²IC₅₀ – концентрация испытуемого соединения, ингибирующая респираторный взрыв макрофагов на 50% по отношению к контролю, ³EC_{max} – максимальная эффективная концентрация (представлена в виде отрицательного десятичного логарифма, моль/л), ⁴E_{max} – максимальный эффект, в % подавления ХЛ, указано среднее значение и ошибка среднего.

Методы исследования

Среды и реагенты. В работе использовали транс-ресвератрол (3,4',5'-тригидроксистильбен), таурин (2-аминосульфоновую кислоту), L-аргинин – «Sigma-Aldrich», Германия; мелатонин (N-(2-(5-метокси-1H-индол-3-ил)-1-пропен-2-амин) – «Serva», Германия; люминесцентный зонд люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазидион); среду Хенкса без индикатора – ОАО «Диалек», Беларусь; диметилсульфоксид – ООО «Фармтехнология», Беларусь; гепарин – РУП «Белмедпрепараты», Беларусь; зимозан (сухие пекарские дрожжи); сыворотку крови крупного рогатого скота – ОАО «Диалек», Беларусь.

Комбинаторные сочетания. На первом этапе исследования изучалась индивидуальное действие транс-ресвератрола, мелатонина, L-аргинина и таурина в диапазоне концентраций от 10⁻⁹ до 10⁻² М. По результатам этих испытаний было обосновано изучение следующих молярных комбинаторных сочетаний: ресвератрола и L-аргинина – P1/A100 и P1/A1000 (10⁻⁸ – 10⁻⁵ М – ресвератрол + 10⁻⁶ – 10⁻² М – L-аргинин); ресвератрола и мелатонина P1/M1, P1/M10 и P1/M100 (10⁻⁸ – 10⁻⁵ М – ресвератрол + 10⁻⁷ – 10⁻⁴ М – мелатонин); L-аргинина и мелатонина A1/M1, A10/M1, A10/M1 (10⁻⁶ – 10⁻² М – L-аргинин + 10⁻⁷ – 10⁻⁴ М – мелатонин); таурина и L-аргинина T1/A1 и T1/A10 (10⁻⁶ – 10⁻² М – таурин + 10⁻⁶ – 10⁻² М – L-аргинин), а также тройных композиций: ресвератрол + мелатонин + L-аргинин в молярных соотношениях P1/M10/A1000 и P1/M100/A1000 (10⁻⁸ – 10⁻⁵ М – ресвератрол + 10⁻⁷ – 10⁻⁴ М – мелатонин + 10⁻⁶ – 10⁻² М – L-аргинин) и ресвератрол + таурин + L-аргинин в молярных соотношениях P1/T100/A100 и P1/T100/A1000 (10⁻⁸ – 10⁻⁵ М – ресвератрол + 10⁻⁶ – 10⁻² М – таурин + 10⁻⁶ – 10⁻² М – L-аргинин).

Получение клеток. Исследования выполнены на перитонеальных макрофагах-резидентах крыс линии Вистар массой 200-250 г. Клетки получали промыванием брюшной полости 20 мл среды Хенкса с гепарином (10 ЕД/мл), отмывали и ресуспендировали в бесцветной среде Хенкса. Полученная суспензия со-

Таблица 2. Индивидуальное и комбинированное действие t-ресвератрола, мелатонина, L-аргинина и таурина на окислительный взрыв макрофагов (по критерию DAUC ХЛ, n=5)

Состав комбинации	КОК ¹	IC ₅₀ ² (-Log, M)		EC _{max} ³ (-Log, M)	E _{max} ⁴ % (M±m)
		Среднее значение	Доверительный интервал (95%)		
t-Ресвератрол	—	5,75	6,23—5,28	5,00	-76,5±5,0
Мелатонин	—	3,70	4,06—3,34	3,00	-67,3±10,5
L-Аргинин	—	2,56	2,95—2,18	2,00	-65,2±7,2
Таурин	—	2,30	2,49—2,10	2,00	-70,8±5,3
Композиция 1 t-Ресвератрол + L-Аргинин					
t-Ресвератрол	1	5,39	5,66—5,12	5,00	-65,6±7,7
L-Аргинин	100	3,39	3,66—3,12	3,00	
t-Ресвератрол	1	5,34	5,65—5,04	5,00	-58,5±9,6
L-Аргинин	1000	2,34	2,65—2,04	2,00	
Композиция 2 t-Ресвератрол + Мелатонин					
t-Ресвератрол	1	6,06	6,64—5,47	5,00	-99,5±1,3
Мелатонин	1	6,06	6,64—5,47	5,00	
t-Ресвератрол	1	6,82	7,13—6,50	5,00	-99,1±0,4
Мелатонин	10	5,82	6,13—5,50	4,00	
t-Ресвератрол	1	7,28	7,71—6,85	6,00	-89,8±5,3
Мелатонин	100	5,28	5,71—4,85	4,00	
Композиция 3 Мелатонин + L-Аргинин					
Мелатонин	1	4,04	4,26—3,82	3,00	-84,9±5,0
L-Аргинин	1	4,04	4,26—3,82	3,00	
Мелатонин	1	4,28	4,51—4,06	3,00	-85,6±3,6
L-Аргинин	10	3,28	3,51—3,06	2,00	
Мелатонин	1	—	—	4,00	-33,0±5,5
L-Аргинин	100	—	—	2,00	
Композиция 4 Таурин + L-Аргинин					
Таурин	1	1,76	2,40—1,33	2,00	-56,8±5,0
L-Аргинин	1	1,76	2,40—1,33	2,00	
Таурин	1	3,71	4,38—3,03	3,00	-74,5±9,9
L-Аргинин	10	2,71	3,38—2,03	2,00	
Композиция 4 Таурин + t-Ресвератрол					
Таурин	100	3,82	5,03—2,62	3,00	-95,6±7,0
t-Ресвератрол	1	5,82	7,03—4,62	5,00	
Таурин	1000	—	—	3,00	-42,8±11,4
t-Ресвератрол	1	—	—	6,00	
Композиция 5 t-Ресвератрол + L-Аргинин + Мелатонин					
t-Ресвератрол	1	6,45	6,79—6,10	5,00	-99,4±4,4
L-Аргинин	1000	3,45	3,79—3,10	2,00	
Мелатонин	100	4,45	4,79—4,10	3,00	
t-Ресвератрол	1	6,17	6,66—5,68	5,00	-97,4±7,8
L-Аргинин	1000	3,17	3,66—2,68	2,00	
Мелатонин	10	5,17	5,66—4,68	4,00	
Композиция 6 Таурин + L-Аргинин + t-Ресвератрол					
Таурин	100	3,76	4,61—2,91	3,00	-87,7±4,7
L-Аргинин	100	3,76	4,61—2,91	3,00	
t-Ресвератрол	1	5,76	6,61—4,91	5,00	
Таурин	100	3,59	4,89—2,29	3,00	-95,2±12,5
L-Аргинин	1000	2,59	3,89—1,29	2,00	
t-Ресвератрол	1	5,59	6,89—4,29	5,00	

держала более 98% жизнеспособных клеток по результатам теста с трипановым синим (0.1%), при дифференцированном подсчете которых в окрашенных мазках, макрофаги составляли около 90%.

Изучение респираторного взрыва.

Макрофагальную продукцию оксидантов исследовали методом люминолзависимой хемилуминесценции (ХЛ) в условиях взрывной (ИХЛ) генерации АФК на люминометре LKB-Wallac 1251 – 002 (Финляндия).

Генерацию АФК оценивали после 10-минутной инкубации клеток с изучаемыми соединениями и их композициями при температуре 20 – 25 °С; контрольные пробы содержали эквивалентное количество среды. Каждый опыт проводился на клетках одного животного и включал весь изучаемый диапазон концентраций агента (комбинаторного сочетания). При исследовании ИХЛ проба содержала в 1 мл бесцветной среды Хенкса: 10⁶ жизнеспособных макрофагов, люминол (7×10⁻⁵ М), опсонизированный зимозан (5×10⁷ частиц), который вносили непосредственно перед регистрацией свечения, изучаемый агент (комбинацию агентов); в контрольные пробы добавляли эквивалентное количество среды.

Люминесценцию регистрировали поочередно в пробах, содержащих изучаемые соединения (композиции) и кон-

Таблица 3. Значения комбинаторного индекса (CI) для комбинаций t-ресвератрола, L-аргинина, мелатонина (AUC ХЛ)

КОК ¹	CI для [IC _{16%} ... _{84%}] ²					M [CI] ₃₀₋₇₀ ³	Итог взаимодействия
	16	30	50	70	84		
t-Ресвератрол + L-Аргинин							
P1/A1000	—						
P1/A100	13,925	9,807	6,799	4,714	3,320	7,956	4-
t-Ресвератрол + Мелатонин							
P1/M1	1,540	0,794	0,398	0,199	0,103	0,563	3+
P1/M10	0,067	0,074	0,082	0,091	0,101	0,085	5+
P1/M100	0,075	0,054	0,039	0,028	0,021	0,045	5+
Мелатонин + L-Аргинин							
M1/A1	2,734	2,186	1,733	1,375	1,103	1,900	3-
M1/A10	0,432	1,494	5,491	20,298	71,311	5,960	4-
M1/A100	—						
t-Ресвератрол + L-Аргинин + Мелатонин							
P1/A1000/M100	2,703	4,774	8,686	15,871	28,368	7,928	4-
P1/A1000/M10	9,906	52,464	299,705	1713,619	9098,133	411,737	5-

Примечание к таблицам 3-5. ¹Комбинаторное отношение компонентов. ²IC_[16%...84%] – концентрации модулятора, ингибирующие оксидантный взрыв на 16...84% по сравнению с контролем (в отсутствие модулятора). ³Средневзвешенное значение, рассчитанное, как $M[CI]_{30-70} = -[3CI_{30} + 2CI_{50} + CI_{70}]/6$.

трольных, при постоянной температуре (37°C), в дискретном режиме с интервалом 2-3 мин, на протяжении 30 мин. Продукцию АФК оценивали по площади под кривой ХЛ (AUC) и площади под кривой ХЛ, исключая фоновое свечение клеток (DAUC). Последний показатель отражает вклад НАДФН-оксидазы II типа (Nox2 – ЕС 1.6.3.1) в продукцию общего пула АФК, генерируемых клеткой. Показатели ХЛ проб, содержащих изучаемые соединения (композиции), выражали в % к значениям контроля. Количество повторных опытов равнялось 5 (n=5).

Статистический анализ. Статистическую обработку пер-

вичных результатов внутри серии проводили с использованием парного t-критерия, межсерийные сравнения выполняли по t-критерию Стьюдента, различия считали достоверными при вероятности ошибки < 5% (p<0,05).

Антиоксидантную активность соединений оценивали по степени подавления ХЛ, вычисляя эффективные ингибирующие концентрации (IC₁₆ – IC₈₄) методом регрессионного анализа с использованием программного пакета «Statistica 6,1» и математических преобразований по T.Chou [10] при помощи специально разработанного алгоритма в программной оболочке MS «Excel».

Анализ взаимодействия. Ре-

зультат взаимодействия тестируемых соединений оценивали по значению комбинаторного индекса (CI), который рассчитывался по формуле (1):

$$CI = \sum_{j=1}^n \frac{(D)_j}{(D_x)_j}, \text{ где } \quad (1)$$

(D)_j – доза (концентрация) агента, оказывающая эффект определенной силы при комбинированном применении; (D_x)_j – доза (концентрация) агента, оказывающая аналогичный эффект при индивидуальном применении.

Значения CI трактовали в соответствии со следующей шкалой [10]: CI < 0,1 – очень сильный синергизм (5+); CI=0,1-0,3 – сильный синергизм (4+); CI=0,3-0,7 – синергизм (3+); CI=0,7-0,85 – умеренный синергизм (2+); CI=0,85-0,90 – слабый синергизм (1+); CI=0,90-1,10 – аддитивный эффект (0); CI=1,10-1,20 – слабый антагонизм (1-); CI=1,20-1,45 – умеренный антагонизм (2-); CI=1,45-3,3 – антагонизм (3-); CI=3,3-10,0 – сильный антаго-

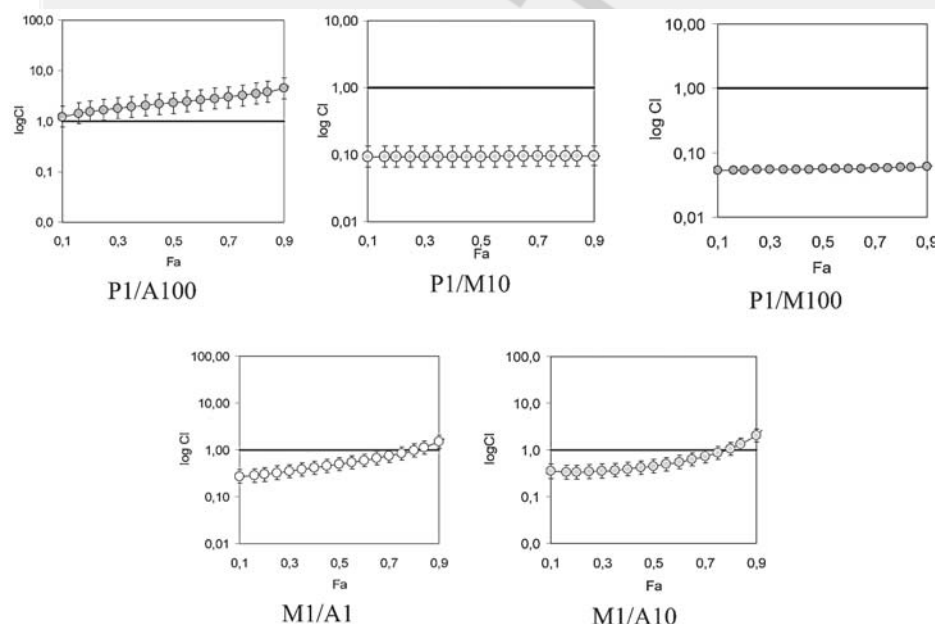


Рис. 1. Характер распределения CI для различных комбинаторных сочетаний t-ресвератрола, мелатонина и L-аргинина (DAUC ХЛ)

CI (Fa-CI-plot) представлен как функция фракции fa, полученная путем расчета по алгоритму T.Chou при fa 0,1-0,95. CI < 1, = 1 и > 1 показывает синергизм, аддитивный эффект и антагонизм, соответственно. Указан 95% доверительный интервал.

Таблица 4. Значения комбинаторного индекса (CI) для комбинации t-ресвератрола, L-аргинина, мелатонина и таурина (DAUC ХЛ)

КОК ¹	CI для $[IC_{16\%} \dots IC_{84\%}]^2$					M [CI] ₃₀₋₇₀ ³	Итог взаимодействия
	16	30	50	70	84		
t-Ресвератрол + L-Аргинин							
P1/A1000	0,509	1,110	2,683	6,710	16,357	2,568	3-
P1/A100	1,421	1,794	2,308	2,981	3,813	2,163	3-
t-Ресвератрол + Мелатонин							
P1/M1	1,460	0,858	0,510	0,289	0,179	0,650	3+
P1/M10	0,094	0,094	0,094	0,095	0,095	0,094	5+
P1/M100	0,053	0,054	0,056	0,057	0,059	0,055	5+
Мелатонин + L-Аргинин							
M1/A1	0,284	0,351	0,496	0,746	1,127	0,465	3+
M1/A10	0,337	0,353	0,453	0,724	1,316	0,448	3+
M1/A100	10,212	4,118	1,669	0,749	0,412	2,740	3-
Таурин + L-Аргинин							
T1/A1	6,781	9,407	13,600	20,206	30,238	12,605	5-
T1/A10	2,133	1,317	0,802	0,493	0,314	1,008	0
Таурин + t-Ресвератрол							
T100/P1	2,115	1,388	0,913	0,609	0,418	1,099	0
T1000/P1	0,417	0,886	3,054	5,023	12,362	2,898	3-
Таурин + L-Аргинин + t-Ресвератрол							
T100/A100/P1	2,680	1,693	1,127	0,786	0,570	1,353	2-
T100/A1000/P1	20,319	13,214	9,075	6,526	4,877	10,720	5-
t-Ресвератрол + L-Аргинин + Мелатонин							
P1/A1000/M100	1,440	0,793	0,511	0,382	0,315	0,631	3+
P1/A1000/M10	2,338	1,169	0,663	0,437	0,326	0,878	1+

низ (4-); >10 – очень сильный антагонизм (5-).

Индекс снижения дозы (DRI) компонентов комбинации рассчитывали по формуле (2):

$$DRI_j = \frac{(D_x)_j}{(D)_j} \quad (2)$$

Значение DRI показывает, во сколько раз можно снизить дозу каждого компонента в комбинации для достижения эффекта, сопоставимого с индивидуальным действием компонента.

Результаты представлены графически в виде распределений комбинаторного индекса (Fa-CI-plot) и индекса снижения дозы/(Fa-DRI-plot), как функция фракции Fa (фракции подавления ХЛ по отношению к контрольным значениям) в эффективном диапазоне E₁₀-E₉₅ (0,1-0,95). CI <1, =1 и >1 показывает синергизм, аддитивный эффект и антагонизм, соответственно. На диаграммах указан 95% доверительный интервал.

Результаты и обсуждение

Индивидуальное действие

Тестирование индивидуального действия соединений выявило значительные различия в их активности. Так в отношении суммарной генерации АФК, оцениваемой нами по АУС ЛХЛ, IC₅₀ ресвератрола составила 1,8 мкМ, для мелатонина этот показатель равнялся 300,0 мкМ. Аминокислоты обладали примерно равноценной активностью с IC₅₀ аргинина 5,6 мМ и 7,0 мМ – таурина. Что касается максимальной эффективности, то в отношении общего количества АФК, генерируемого макрофагами, лишь ресвератрол демон-

стрировал 70% ингибирование, остальные соединения подавляли процесс примерно на 50% в максимальных испытанных концентрациях (таблица 1).

В отношении Nox2-зависимого процесса (связанного с активацией NADPH-оксидазы фагоцитов) максимальная эффективность всех испытанных соединений была сопоставима и достигала примерно 70% (таблица 2). Эти результаты стали основанием для испытаний различных комбинаторных сочетаний аминокислот и антиоксидантов.

Комбинированное действие

Максимальная эффективность испытанных комбинаций представлена в таблицах 1 и 2. В одних комбинаторных сочетаниях максимальная эффективность увеличивалась в сравнении с индивидуальным действием, в других – уменьшалась, оценить реальный потенциал взаимодействия позволил анализ по методу T.Chou [10]. Результаты этого анализа представлены в таблицах 3-5 и на рисунках 1-3 в виде комбинаторных индексов, рассчитанных для разных уровней эффекта.

В отношении совокупной и Nox2-зависимой генерации АФК результаты сильно различались. Что касается совокупной генерации АФК, то вычислить CI удалось не для всех испытанных комбинаторных сочетаний. Для композиций P1/A1000, M1/A100, T1/A1, T1/A10, T1000/P1 такой анализ оказался невозможен в силу отсутствия линейной зависимости эффекта от концентрации. Эти комбинации, а также другие с включением таурина, оценивали только по результатам действия на Nox2-зависимый процесс.

Как видно из таблицы 3, среди различных сочетаний рес-

Таблица 5. Значения индекса снижения дозы (DRI) для комбинаций t-ресвератрола, L-аргинина, мелатонина (DAUC ХЛ)

КОК ¹	Компонент	DRI для [IC _{16%} ... ² 94%]					M [DRI] ₃₀₋₇₀ ³
		16	30	50	70	84	
t-Ресвератрол + Мелатонин							
P1/M1	Мелатонин	106,4	153,1	224,1	327,9	472,0	205,9
	t-Ресвератрол	0,7	1,2	2,0	3,4	5,8	1,8
P1/M10	Мелатонин	175,4	151,3	129,6	111,1	95,8	157,4
	t-Ресвератрол	11,4	11,5	11,6	11,7	11,8	11,6
P1/M100	Мелатонин	47,5	42,7	38,1	34,0	30,5	39,7
	t-Ресвератрол	30,8	32,3	33,9	35,7	37,5	33,4
Мелатонин + L-Аргинин							
M1/A10	Мелатонин	17,1	8,2	3,8	1,8	0,8	5,7
	L-Аргинин	3,6	4,3	5,3	6,4	7,7	5,0
M1/A1	Мелатонин	5,2	3,4	2,2	1,4	0,9	2,7
	L-Аргинин	10,9	17,9	29,9	50,1	82,0	27,3
t-Ресвератрол + L-Аргинин + Мелатонин							
P1/A1000/M100	t-Ресвератрол	3,3	4,0	5,0	6,1	7,5	4,7
	L-Аргинин	1,1	2,8	7,7	21,2	55,8	7,5
	Мелатонин	5,1	5,3	5,6	5,8	6,1	5,5
P1/A1000/M10	t-Ресвератрол	1,8	2,2	2,6	3,2	3,9	2,5
	L-Аргинин	0,6	1,5	4,1	11,0	28,7	4,0
	Мелатонин	27,4	28,3	29,3	30,3	31,4	28,9

вератрола, мелатонина и аргинина, в отношении совокупной генерации АФК синергично работала только двухкомпонентная композиция ресвератрола и мелатонина. Все испытанные комбинаторные сочетания аргинина обнаружили антагонизм. Сильный антагонизм был выявлен и при введении аргинина в синергичные до того композиции мелатонина и ресвератрола.

Что касается Nox2-зависимого процесса, то фармакодинамические взаимодействия компонентов были иными (рисунок 1, таблица 4).

Если результат взаимодействия аргинина и ресвератрола, а также ресвератрола и мелатонина оставался прежним, то мелатонин и аргинин демонстрировали синергичное действие в сочетаниях M1/A1 и M1/A10, которое уменьшалось при увеличении концентрации компонентов. Следует отметить, что антагонизм ресвератрола и аргинина с увеличением их концентраций нарастал.

Тройная композиция также демонстрировала дозозависимый синергизм в сочетании P1/A1000/M100 и слабый дозозависимый синергизм в сочетании P1/A1000/M10. Интересно, что если в отношении совокупной генерации АФК с увеличением концентрации усиливался антагонизм (рисунок 2), то в отношении Nox2-зависимой генерации нарастал синергизм, что позволяет в разы изменять концентрации компонентов (рисунок 2, Fa-DRI-plot; таблица 5) и может расцениваться как «запас прочности» таких комбинаций в условиях in vivo.

Что касается композиций таурина, то если сочетания T1/A10 и T100/P1 демонстрировали аддитивное действие на Nox2-зависимый процесс, легко сменяющееся антагонизмом при флюктуациях молярных соотношений компонентов, то тройные композиции таурина, аргинина и ресвератрола демонстрировали умеренный антагонизм в обоих изученных комбинаторных сочетаниях (таблица 4), по-видимому, за счет антагонизма ресвератрола и аргинина. Относительно совокупной генерации АФК антагонизм был настоль-

ко сильным, что практически нивелировал ингибирующие эффекты соединений на респираторный взрыв макрофагов (таблица 2).

Обсуждение

Взаимодействия ресвератрола, мелатонина, аргинина и таурина можно представить графически в виде полигограмм (рисунок 3).

Прежде, чем перейти к обсуждению взаимодействия ресвератрола, мелатонина, аргинина и таурина, необходимо описать антиоксидантный профиль каждого из них.

Транс-ресвератрол не обладает способностью перехватывать и нейтрализовать супероксидный анион (O₂•⁻), не ингибирует активность ксантиноксидазы (второго по значимости продуцента O₂•⁻ в клетках), но дозозависимо ингибирует НАДФН-N⁺-оксидазу (Nox1 аорты, например, с IC₅₀=4,8 мкМ) [23]. Эффект обусловлен с подавлением связывания на мембране важнейших субъединиц фермента – gp91phox и Rac1. Ингибирующее действие при этом не зависит от природы индуктора (окисленные ЛПНП, ангиотензин-II, форболовые эфиры и др. [10]). Ресвератрол усиливает передачу сигнала в системе L-арг-NO-цГМФ, но на активность NO-синтазы (NOS), по крайней мере, эндотелиальной, не влияет и не повышает биосинтез NO• в остром опыте, однако при субхроническом и хроническом введении усиливает экспрессию фермента в эндотелиальных клетках артерий [23]. Кроме того, транс-ресвератрол ингибирует окисление полиненасыщенных жирных кислот и подавляет перекисное окисление липидов [10].

Мелатонин обладает широким антирадикальным профилем и способен взаимодействовать практически со всеми АФК, генерируемыми при респираторном взрыве макрофагов: O₂•⁻, перекисью водорода (H₂O₂), гидроксильным радикалом (•OH), синглетным кислородом (O₂¹), оксидом азота (NO•), пероксинитрит-анионом (ONOO⁻). При этом скорость нейтрализации мелатонином O₂•⁻ (k=1,2·10⁹ M⁻¹s⁻¹) сопоставима со скоростью образования ONOO⁻ из O₂•⁻ и NO•

($k=5,0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) [32, 25].

Показано также, что мелатонин обладает непрямыми антиоксидантными свойствами, стимулируя активность СОД, пероксидазы, глутатионредуктазы, каталазы [4]; он способен ингибировать синтез $\text{NO} \bullet$ в клеточных культурах, угнетая активность NOS [12], снижать стимулированную ЛПС продукцию простагландина $F_{1\alpha}$ и активность фактора NF- κB [13], запуская генерацию АФК в лейкоцитах. Наличие на мембранах человеческих лейкоцитов мелатониновых рецепторов [4, 13, 25] позволяет предполагать его участие в регуляции иммунного ответа. Конечный результат лиганд-рецепторных взаимодействий мелатонина может быть различным. В одних исследованиях установлено повышение внутриклеточной концентрации цАМФ, приводящее к подавлению активности Nox2 и снижению количественного выхода АФК [4], в ряде других работ показано стимулирующее действие мелатонина на секрецию ИЛ-2 и усиление генерации АФК через индукцию протеинкиназы С [4, 25, 27]. Очевидно, конечный результат мелатониновой стимуляции лейкоцитов пока трудно предсказуем и зависит от условий реализации клеточной активности. Какова бы ни была природа модулирующего действия мелатонина на оксидантные процессы, в большинстве тестовых систем его эффекты регистрируются при концентрациях, соответствующих локальным в системе диффузной нейроэндокринной регуляции ($10^{-7} - 10^{-5} \text{ M}$), что дает основание рассматривать мелатонин, как физиологический модулятор иммунного и антиоксидантно-

го статуса.

L-Аргинин, как известно, является субстратом NOS. Именно генерацией $\text{NO} \bullet$ исходно объясняли кардиопротекторные и цитопротекторные эффекты аргинина. Однако, в дальнейшем было установлено, что внутриклеточные концентрации аргинина составляют 500-800 мкМ, и намного превосходят K_m для NOS – 2-4 мкМ, поэтому представляется маловероятным, чтобы увеличение концентраций в клетке аргинина было критичным для синтеза $\text{NO} \bullet$ [17]. Исследование антиоксидантного потенциала аргинина показало, что он сам по себе способен нейтрализовать $\text{O}_2 \bullet^-$; на модели ксантиноксидазной генерации супероксида его $\text{IC}_{50}=300 \text{ мкМ}$. По данным электронной парамагнитной резонансной спектроскопии активность L-аргинина при взаимодействии с $\text{O}_2 \bullet^-$ по показателю $\text{IC}_{50}=75,0 \text{ мкМ}$, а $k=4,8 \cdot 10^3 \text{ M c}^{-1}$ [17]. При этом L-аргинин может работать как в межклеточной среде, так и внутриклеточно, при условии активного трансмембранного переноса. Показано также, что преинкубация лейкоцитов с аргинином усиливает продукцию H_2O_2 и активность миелопероксидазы (МПО), но снижает образование $\text{O}_2 \bullet^-$ [20].

Таурин (2-аминоэтансульфоновая кислота) в физиологических условиях образуется из гипотаурина и содержится в биологических жидкостях в достаточно высоких концентрациях. В сыворотке крови концентрация таурина у здоровых людей составляет порядка 120 мкМ, внутриклеточные концентрации могут достигать десятков моль/л. Например, в нейтрофилах цитозольная концентрация таурина составляет порядка 50 мМ, его

метаболического предшественника гипотаурина – 1 мМ [8]. Такие высокие концентрации породили вопрос о биологическом значении таурина, однозначного ответа на который до сих пор не получено. Исследование антирадикальных свойств таурина показало, что он практически не взаимодействует с $\text{O}_2 \bullet^-$, H_2O_2 , но способен нейтрализовать $\bullet\text{OH}$ с $k=2,42 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Его метаболический предшественник гипотаурин делает это намного эффективнее ($k=1,15 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) [1], именно гипотаурин сегодня рассматривается как биогенная «ловушка» АФК. Однако благодаря способности нейтрализовать гипохлорную кислоту (НОС) и цитотоксические альдегиды – конечные продукты реакций пероксидации – таурин все же считается одним из главных биогенных цитопротекторов [8]. Особое значение в сохранении редокс-гомеостаза имеет взаимодействие таурина и НОС) в реакции (1) с образованием N-хлоротау-

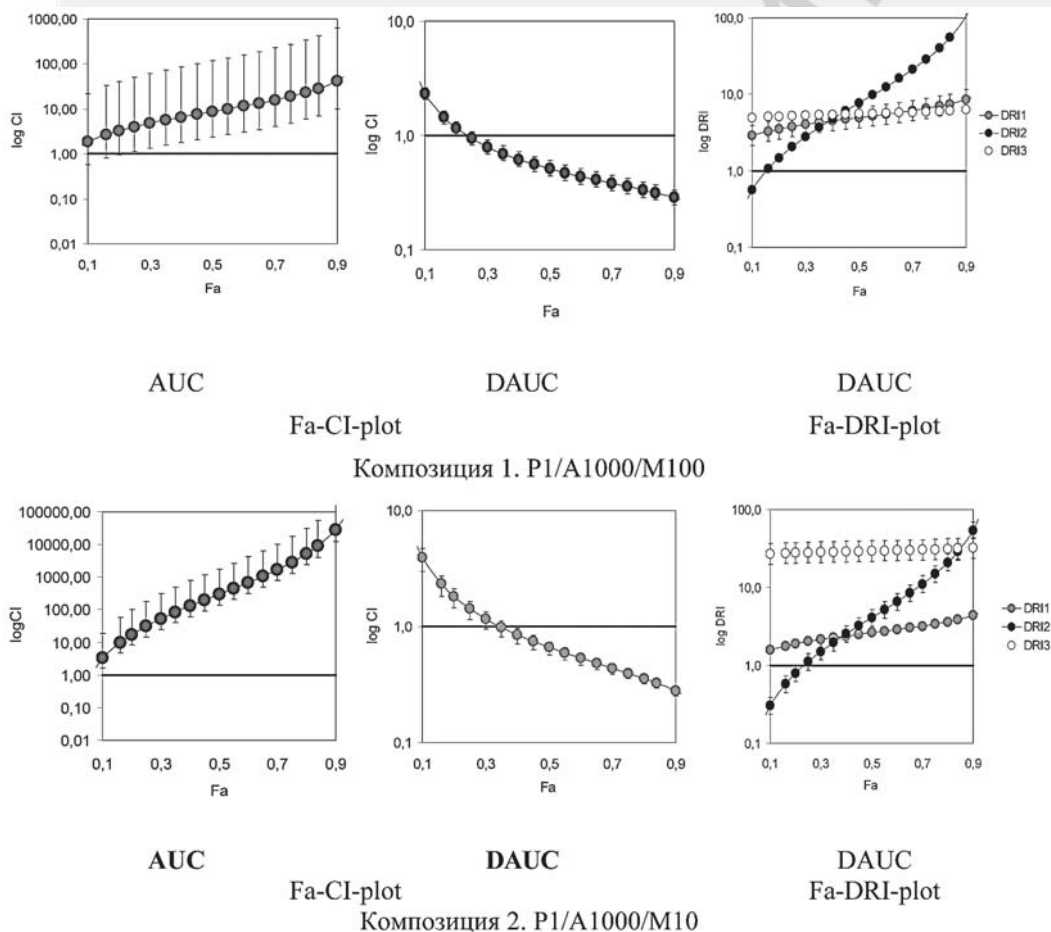
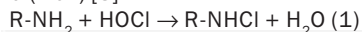


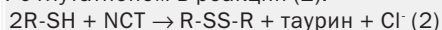
Рис. 2. Характер распределения CI (Fa-CI-plot) и DRI (Fa-DRI-plot) для комбинаций **t-ресвератрол + L-аргинин + мелатонин**

CI (Fa-CI-plot) представлен как функция фракции fa, полученная путем расчета по алгоритму Chou при fa 0,1-0,95. CI < 1, = 1 > 1 показывает синергизм, аддитивный эффект и антагонизм, соответственно. Указан 95% доверительный интервал.

рина (NCT) [8]:



Источником HOCl *in vivo* являются полиморфноядерные лейкоциты и моноциты, небольшое количество гипохлорида генерируется и в макрофагах, что обеспечивается активностью миелопероксидаз (МПО) при респираторном взрыве. Преинкубация лейкоцитов с таурином значительно повышает его внутриклеточную концентрацию, снижает содержание нейтральных аминокислот, образование H_2O_2 и $O_2^{\bullet-}$, однако активность МПО усиливается [20]. Поскольку таурин составляет более 50% от всего количества аминокислот, содержащихся в цитоплазме лейкоцитов, постольку главным продуктом реакции (1) является NCT, который обладает высокой стабильностью по сравнению с гипохлоридом. Образование NCT считается механизмом детоксикации гипохлорида, избыток которого оказывает сильное цитотоксическое действие. Как и гипохлорид, NCT обладает бактерицидным действием, но его эффективные концентрации (55мМ), намного превышают физиологические (10-50мкМ). Поэтому считается, что NCT выполняет скорее регуляторные функции. Так в частности показано, что NCT подавляет активность индуцибельной NOS, выброс NO^{\bullet} и синтез ФНО-альфа в макрофагах [23]. Это сопровождается ингибированием перемещения в ядро клетки NF-κB и пролонгированием присутствия IκB в цитоплазме клеток благодаря подавлению сигнальных механизмов активации киназы IκB [8, 19]. Не исключено, что важную роль в этом играет взаимодействие NCT с глутатионом в реакции (2):



Известно, что окисление глутатиона имеет ключевое значение в редокс-регуляции ферментативной активности [16]. Хотя надежных доказательств участия таурина в редокс-регуляции *in vivo* до сих пор не получено. Это, тем не менее, не мешает его широкому клиническому применению при патологии, ассоциированной с оксидантным стрессом, в том числе в различных сочетаниях с другими антиоксидантами [3, 5, 6].

На основании полученных результатов, а также известных свойств испытанных соединений, их взаимодействие можно представить следующим образом (рисунок 4).

Поскольку ресвератрол блокирует активность Nox2, синтезированный НАДФН- H^+ захватывается NOS, которая в присутствии избытка субстрата (L-аргинина) начинает генерировать относительно высокое количество NO^{\bullet} . Оксид азота, в свою очередь, взаимодействует с люминолом, из-за чего усиливается световая эмиссия, которая в дальнейшем оценивается, как антагонизм ресвератрола и аргинина.

Усиление генерации NO^{\bullet} может иметь двойное значение *in vivo*. С одной стороны это может обеспечить вазодилатацию, и, казалось бы, желательно с позиции кардиопротекторного действия. Однако не следует забывать, что NO^{\bullet} является высоко активным радикалом, быстро взаимодействующим с иными радикальными продуктами и биомолекулами, в условиях оксидантного дисбаланса это будет вес-



Рис. 3. Взаимодействие t-ресвератрола, мелатонина, L-аргинина и таурина на модели респираторного взрыва фагоцитов по результатам испытания наиболее рациональных комбинационных сочетаний: P1/A100, P1/M100, M1/A1, P1/A100/M100; T1/A10, T100/P1, T100/A100/P1.

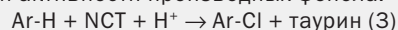
Условные обозначения: — очень сильный синергизм (5+), — синергизм (3+), — аддитивный эффект (0), - - - умеренный антагонизм (2-), - антагонизм (3-), ■■■■ - сильный антагонизм (4-).

ти к цитотоксическому действию.

Введение в такую систему мелатонина, вероятно, обеспечивает элиминацию избытка NO^{\bullet} , как за счет прямого взаимодействия с радикалом, так и за счет угнетения активности NOS. Вследствие этого трехкомпонентная комбинация будет в целом демонстрировать синергизм на модели респираторного взрыва (рисунок 3.2.), тем более сильный, чем больше мелатонина входит в состав комбинации (таблица 4). Что касается двойной комбинации аргинина с мелатонином, то в условиях равного содержания компонентов или относительно небольшого избытка аргинина (M1/A10), компоненты, действующие в целом синергично, в области высоких концентраций могут вступать в конкурентные отношения, как на уровне NOS, так и на уровне прямого антирадикального действия, что проявляется нарастанием антагонизма (таблица 4).

В отношении совокупной генерации АФК, мелатонин и аргинин вступают в антагонистические отношения, тем более выраженные, чем больше аргинина содержит композиция. Причиной этого может быть увеличение активности «базовых» генераторов АФК, например, пероксидаз или подавление активности антиоксидантных ферментов. Антагонизм еще более усиливается при появлении в клетке ресвератрола (таблица 3, рисунок 3.1.).

Что касается таурина, то поскольку он не обладает прямой антиоксидантной активностью в отношении тех форм АФК, которые генерируются при респираторном взрыве и перехватываются люминолом, постольку его корректирующие влияния на взаимодействие ресвератрола и аргинина уступают таковым мелатонина. Аддитивное действие двухкомпонентных композиций таурина с аргинином и ресвератролом не устойчиво и легко сменяется антагонизмом при относительном увеличении количества таурина (таблица 4) и возможно обеспечивается особыми свойствами NCT, среди которых в этой связи привлекает внимание способность вступать в реакции с ароматическими соединениями (реакция 3), результатом чего может быть подавление биологической активности производных фенола:



А также способность NCT взаимодействовать с другими аминокислотами в реакции транс-галогенирования (реакция 4). При комнатной температуре равновесие в этой реакции достигается в течение минут и не требует присутствия

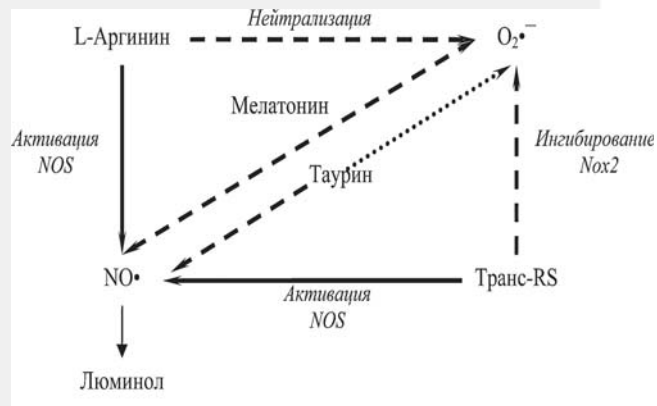
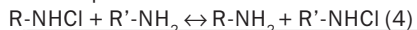


Рис. 4. Антиоксидантные эффекты транс-ресвератрола (транс-RS), L-аргинина, мелатонина и таурина на модели макрофагальной генерации АФК

Транс-ресвератрол блокирует Nox2 и генерацию супероксида ($O_2^{\bullet-}$), но активирует NOS (непрямое действие); L-аргинин активирует NOS и нейтрализует $O_2^{\bullet-}$. Образовавшийся избыток NO^{\bullet} окисляет люминол. Мелатонин нейтрализует АФК и угнетает активность NOS, таурин не взаимодействует с АФК, но ингибирует NOS. Пояснения в тексте.

катализаторов.



Несмотря на то, что макрофаги продуцируют незначительные количества гипохлорной кислоты, возможно именно реакции (3) и (4) стали причиной антагонистических взаимодействий таурина с аргинином и ресвератролом.

В целом антагонизм испытанных антиоксидантов свидетельствует о неэффективности прямых антирадикальных взаимодействий компонентов с АФК и друг с другом, или, по крайней мере, о том, что скорость этих взаимодействий слишком низка и уступает скорости взаимодействия АФК с люминофором. Из этого следует важный вывод. Комбинации антирадикальных соединений должны включать компоненты, не только дополняющие друг друга по абсолютному антирадикальному спектру или биологической активности, но также ускоряющие радикальные взаимодействия друг друга. Это особенно важно, когда в основе антиоксидантного действия лежит прямой антирадикальный эффект соединений.

Тот факт, что появление в синергичной комбинации дополнительного соединения, демонстрировавшего одностороннее с компонентами комбинации индивидуальное действие, полностью меняет характер взаимодействия и результирующий эффект всей комбинации, свидетельствует о необходимости тщательного доклинического изучения любых композиций лекарственных средств перед их апробацией в клинической практике. В настоящее время этим правилом пренебрегают.

Выводы

1. На модели Nox2-зависимой генерации АФК в макрофагах взаимодействие аргинина с ресвератролом соответствует критериям антагонизма, с мелатонином – синергизма, с таурином – аддитивности в наиболее выгодных молярных сочетаниях.

2. Результат взаимодействия таурина с ресвератролом и мелатонином зависит от молярного соотношения компонентов и их концентраций и колеблется от аддитивного взаимодействия до антагонизма.

3. Трехкомпонентная комбинация ресвератрола, мелатонина и аргинина демонстрирует синергизм, тем более выраженный, чем больше мелатонина входит в состав композиции. Замена мелатонина на таурин приводит к антагонизму компонентов.

Литература

1. Бизунок, Н.А. Фармакодинамические взаимодействия антиоксидантов альфа-токоферола и аскорбата на модели респираторного взрыва фагоцитов / Н.А. Бизунок // Медицинский журнал 2011. № 3. В печати.
2. Бизунок, Н.А. Производные аминокислот – потенциальные модификаторы клеточной продукции оксидантов / Н.А. Бизунок // Рецепт. 2006. №3. С. 28 – 32.
3. Заволовская, Л.И. Клиническая эффективность тауфона в комбинированном лечении больных с хронической недостаточностью кровообращения / Л.И. Заволовская, Е.П. Елизарова, В.А. Орлов // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1995. Т. 58. С. 29 – 32.
4. Зозуля, Ю.А. Свободно-радикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга / Ю.А. Зозуля, В.А. Барабой, Д.А. Сутковой // М. 2000.
5. Шестакова, М.В. Опыт применения дикбора при сахарном диабете 2-го типа / М.В. Шестакова, Л.А. Чугунова, М.Ш. Шахалова // Сахарный диабет. 2007. № 1. С. 30 – 31.
6. Anthrayose, C.V. Studies on protein and taurine in normal, senile and diabetic cataractous human lenses / C.V. Anthrayose, S. Shashidhar // Indian J Physiol Pharmacol. 2004. Vol. 48. № 3. P. 357 – 360.
7. Aruoma, O.I. The antioxidant action of taurine, hypotaurine, and their metabolic precursors / O.I. Aruoma [et al.] // Biochem. J. 1988. Vol. 256. P. 251 – 255.
8. Barua, M. Taurine Chloramine Inhibits Inducible Nitric Oxide Synthase and TNF- α Gene Expression in Activated Alveolar Macrophages:

Decreased NF- κ B Activation and I κ B Kinase Activity / M. Barua, Y. Liu, M.R. Quinn // J. Immunol. 2001. 167. P. 2275 – 2281.

9. Chang, L. Taurine protected myocardial mitochondria injury induced by hyperhomocysteinemia in rats / L. Chang // Amino Acids. 2004. Vol. 27. № 1. P. 37 – 48.

10. Chou, T.-Ch. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies / T.-Ch. Chou // Pharmacological reviews. 2006. Vol. 58. P. 621 – 681.

11. Chow, Shu-Er Resveratrol attenuates oxLDL-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidative functional damages / Shu-Er Chow [et al.] // J. Appl. Physiol. 2007. Vol.102. P. 1520 – 1527.

12. Crespo, E. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats / E. Crespo [et al.] // FASEB J. 1999. Vol. 13. № 12. P. 1537 – 1546.

13. Gilad, E. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NF κ B activation / E. Gilad [et al.] // FASEB J. 1998. Vol. 12. P. 685 – 693.

14. Gottardi, W. N-chlorotaurine, a natural antiseptic with outstanding tolerability / W Gottardi, M Nagl // J Antimicrob Chemother. 2010. Vol. 65. P. 399 – 409.

15. Green, T.R. Antioxidant role and subcellular location of hypotaurine and taurine in human neutrophils / T.R. Green [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta. 1991. Vol. 1073. P. 91 – 97.

16. Jones, D.P. Radical-free biology of oxidative stress / D.P. Jones // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2008. Vol. 295. P. C849 – C868.

17. Lass, A. Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine / A. Lass [et al.] // Molecular pharmacology. 2002. Vol. 61. № 5. P. 1081 – 1088.

18. Leiro, J. Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes / J. Leiro [et al.] // J. Leukoc. Biol. 2004. Vol. 75. P. 1156 – 1165.

19. Miao, J. The effect of taurine on the toll-like receptors/nuclear factor kappa B (TLRs/NF- κ B) signaling pathway in Streptococcus uberis-induced mastitis in rats / J. Miao [et al.] // Int. Immunopharmacology. 2011 In press.

20. Muhling, J. Effects of arginine, L-alanyl-L-glutamine or taurine on neutrophil (PMN) free amino acid profiles and immune functions in vitro / J. Muhling [et al.] // Amino Acids. 2002. Vol. 22. № 1, P. 39 – 53.

21. Muhling, J. Which mechanisms are involved in taurine-dependent granulocytic immune response or amino- and α -keto acid homeostasis? / J. Muhling [et al.] // Amino Acids. 2008. Vol. 34. № 2. P. 257 – 270.

22. Ogasawara, M. Reactivity of taurine with aldehydes and its physiological role / M. Ogasawara [et al.] // Chem. Pharm. Bull. 1993. Vol. 41. P. 2172 – 2175.

23. Opie, L.H. The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules / L.H. Opie, S. Lecour // European Heart Journal. 2007. Vol. 28. P. 1683 – 1693.

24. Orallo, F. The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption / F. Orallo [et al.] // Molecular pharmacology. 2002. Vol. 61. № 2. P. 294 – 302.

25. Reiter, R.J. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans / R.J. Reiter, [et al.] // Acta biochimica polonica. 2003. Vol. 50. № 4. P. 1129 – 1146.

26. Reiter, R.J. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage // R.J. Reiter [et al.] // Pol. J. Pharmacol. 2004. Vol. 56. P. 159 – 170.

27. Reiter, R.J. Free radical mediated molecular damage: mechanisms of melatonin's protective actions in the central nervous system / R.J. Reiter [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2001. Vol. 939. № 1. P. 200 – 215.

28. Saransaari, P. Taurine and neural cell damage / P. Saransaari, S.S. Oja // Amino Acids. 2000. Vol. 19. № 3 – 4. P. 509 – 526.

29. Song, Y.S. Methionin-induced hyperhomocysteinemia promote superoxide anion generation and NF κ B activation in peritoneal macrophages of C57BL/6mice / Y.S. Song, M.E. Rosenfeld // J. Med. Food. 2004. Vol. 7. № 2. P. 229 – 234.

30. Taranukhin, A.G. Taurine reduces caspase-8 and caspase-9 expression induced by ischemia in the mouse hypothalamic nuclei / A.G. Taranukhin [et al.] // 2008. Vol. 34. № 1. P. 169 – 174.

31. Walle, T. Bioavailability of resveratrol / T.Walle // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2011. Vol. 1215. P. 9 – 15.

32. Ximenes, V.F. Superoxide-dependent oxidation of melatonin by myeloperoxidase // V.F. Ximenes [et al.] // The journal of biological chemistry. 2005. Vol. 280. № 46. P. 38160 – 38169.

Поступила 20.09.2011 г.